

Л. И. ПЕРШИНА, ААЗЕ ХВИДТ

**ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОМ ДЕЙТЕРООБМЕНА КОНФОРМАЦИОННЫХ  
ИЗМЕНЕНИЙ КОМПЛЕКСА, ОБРАЗОВАННОГО ТРИПСИНОМ  
И ЕГО ИНГИБИТОРОМ**

(Представлено академиком Е. М. Крепсом 4 XI 1974)

Метод изотропного водородного обмена успешно используется для анализа конформационных изменений белков в энзим-лигандных системах (<sup>1-4</sup>). В настоящей работе сочетанием методов дейтерообмена и инфракрасной спектроскопии изучались трипсин, основной панкреатический трипсиновый ингибитор (ОПТИ) и их стехиометрический комплекс (1:1).

Задача исследования заключалась в том, чтобы по кинетическим данным дейтерообмена оценить доступность к обмену различных внутренних участков белковых молекул. При этом результаты измерений Н-D-обмена выражались степенью доступности пептидных групп изотропному растворителю и изменением стандартной свободной энергии конформационных превращений, при которых достигается эта доступность.

Экспериментальные данные интерпретировались на основе теории, разработанной Хвидт и Нильсеном (<sup>5, 6</sup>), согласно которой изотопный обмен в растворах белков протекает в соответствии с так называемым EX<sub>2</sub>-механизмом, т. е. обмен сильно катализируется протонами и гидроксильными ионами. Фракция X необменяемых пептидных групп выражается:

$$X = n^{-1} \sum_{i=1}^n \exp(-\beta^{(i)} t), \quad (1)$$

где  $n$  — число пептидных групп,  $t$  — время,  $\beta^{(i)}$  — константа скорости реакции первого порядка  $i$ -й пептидной группы.

$$\beta^{(i)} = \rho^{(i)} k_0, \quad (2)$$

где  $\rho^{(i)}$  — вероятность нахождения  $i$ -й пептидной группы в доступном для растворителя состоянии,  $k_0$  — константа скорости обмена пептидных групп, доступных растворителю.  $k_0$  определяется по формуле

$$k_0 = (10^{-pH} + 10^{pH-6}) \cdot 10^{0,05(\theta-25)} \text{ сек}^{-1}, \quad (3)$$

где  $\theta$  — температура в °С.

Изменение стандартной свободной энергии  $\Delta G^{0(i)}$  конформационных превращений, при которых пептидные группы становятся доступными изотопному растворителю, вычисляется по формуле

$$\Delta G^{0(i)} = RT \ln (\rho / (1 - \rho)). \quad (4)$$

Трипсин и ОПТИ (кристаллические), фирма «Novo», Копенгаген, использовались без дополнительной очистки. Комплекс трипсин — ингибитор получали путем смешивания и 1,5-часового выдерживания при комнатной температуре растворов, содержащих 2% трипсин и 0,5% ОПТИ. Тяжелая вода (фирма «Norsk Hydro») содержала 99,7% D<sub>2</sub>O. Образцы приблизительно 2% растворов белков при pH ≈ 3 и pH ≈ 6 по 500 мкл каждый лиофильно высушивались над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, и лиофилизированные пробы растворяли в 500 мкл D<sub>2</sub>O перед измерением Н-D-обмена. pH определяли в растворах

D<sub>2</sub>O на pH-метре «Radiometer», модель ТТТ 1с с микроэлектродом типа G 222 1с. Водородно-дейтериевый обмен пептидных групп белков в D<sub>2</sub>O измерялся с помощью инфракрасной спектроскопии (7-9). Использовался спектрофотометр IR-9 «Beckman» и кюветы с флюоритовыми окнами; толщина рабочего слоя в кювете составляла 0,1 мм. Температура раствора измерялась термомпарой, вставляемой непосредственно в кювету. Оптическое поглощение в максимуме полосы амид II (около 1550 см<sup>-1</sup>), обусловленной -CONH-группами, записывалось при температуре 25° как функция

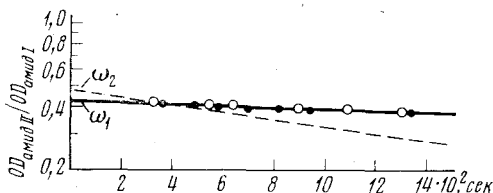


Рис. 1. Оценка  $\omega$  (уравнение 5) для 2% ОПТИ, pH 3,0, 10°, при экстраполяции к нулю времени результатов измерения  $OD_{амид II}/OD_{амид I}$

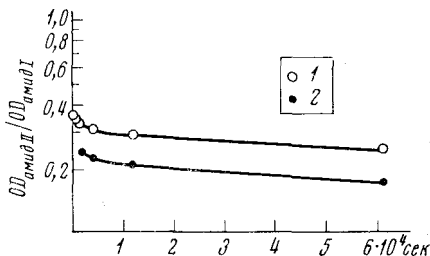


Рис. 2. Сравнительное определение отношения  $OD_{амид II}/OD_{амид I}$  для 2% ОПТИ, pH 3,2 и 25°. Точки 1 измерены как высоты пиков в максимумах полос, точки 2 — как спектральные площади

времени. Обмен прослеживался в интервале от 3—5 мин. (начало измерений) до 20—25 час. В подходящие периоды времени сканировалась спектральная область 1300—1800 см<sup>-1</sup>. Фоновое поглощение полосы амид II, т. е. поглощение после полного дейтерирования пептидных групп, определялось после нагревания раствора трипсина до 65° и раствора ОПТИ до 80° в течение нескольких часов. Фоновое поглощение полосы амид II для комплекса трипсин — ингибитор не удалось измерить прямо. Поэтому оно вычислялось как сумма фоновых поглощений составляющих белков.

Полоса амид I (около 1650 см<sup>-1</sup>), обусловленная -CO-колебаниями пептидных групп, была ничтожно чувствительной к H-D-обмену и использовалась для оценки общей концентрации пептидных групп.

Фракция X необмененных (-CONH-) пептидных групп для данного момента времени определялась из кинетических спектров обмена:

$$X = OD_{амид II} / \omega \cdot OD_{амид I}, \quad (5)$$

где  $\omega$  — величина отношения оптических плотностей  $OD_{амид II}/OD_{амид I}$  во время, равное нулю, т. е. это величина отношения для полностью недеитерированного белка.

И.к. спектрометрическое измерение  $\omega$  представляет существенные методические трудности (10). Мы определяли  $\omega$  в растворах белков в D<sub>2</sub>O при пониженной температуре (10°) и pH 3,0 с последующей экстраполяцией экспериментальных данных к нулю времени, как показано на рис. 1 для ОПТИ. Величина  $\omega$  вычислялась как средняя из двух величин:  $\omega = 1/2(\omega_1 + \omega_2)$ .  $\omega_1$  получена при прямолинейной экстраполяции к  $t=0$  экспериментальных точек, измеренных за период от 330 сек. до 2500 сек.  $\omega_2$  — это ордината при  $t=0$ , отсекаемая прямой линией, проходящей через экспериментальную точку при  $t=330$  сек. и проведенной с наклоном, соответствующим величине  $k_0$ , вычисленной по формуле (3). По данным наших измерений,  $\omega$  для ОПТИ была равна 0,46, а для трипсина 0,40. Значение, равное 0,40, мы приняли как величину  $\omega$  для растворов, содержащих 2% трипсин и 0,5% ОПТИ.

У всех изучаемых белков мы сопоставляли отношения оптических плотностей  $OD_{амид II}/OD_{амид I}$ , измеренных в максимумах полос, с отношениями интегральных поглощений. Результаты сравнительного измерения,

показанные на рис. 2 для ОПТИ, убедительно демонстрируют пропорциональность между сопоставленными величинами. Это послужило основанием рассчитывать кинетические данные дейтериеобмена более простым из двух способов, а именно, как отношения оптических плотностей в максимумах амидных полос.

Рис. 3 иллюстрируют и.к. спектры комплекса трипсин — ингибитор, записанные при 25°, рН 3,0 и рН 6,0 в различные моменты времени. И.к. спектры трипсина и ОПТИ качественно мало отличались от спектров комплекса. Белковые полосы представлены амидом I и амидом II. Полоса

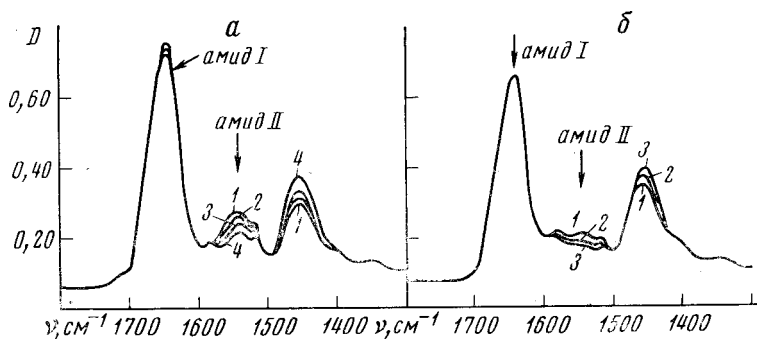


Рис. 3. И.к. спектры комплекса трипсин — ингибитор в D<sub>2</sub>O, 25°. а — рН 3,1: 1 — 27 мин., 2 — 63 мин., 3 — 180 мин., 4 — 21 час., б — рН 6,2: 1 — 27 мин., 2 — 118 мин., 3 — 23 часа

амид II уменьшалась во времени, а образующиеся —COND-группы и НOD имели поглощения в области 1400—1500 см<sup>-1</sup>. Во всех спектрах присутствовал полоса у 1515 см<sup>-1</sup>, приписываемая тирозину<sup>(11)</sup>, и полоса с 1575 см<sup>-1</sup>, обусловленная СОО<sup>-</sup>-группами<sup>(12)</sup>. Только в трипсине при рН 3,0, полоса у 1575 см<sup>-1</sup> отсутствовала. У ОПТИ при обоих значениях рН наблюдалось четко выраженное плечо у 1615—1620 см<sup>-1</sup>, что может служить доказательством присутствия антипараллельной β-структуры в конформации этого белка<sup>(13, 14)</sup>.

Кинетические данные Н—D-обмена водородных атомов пептидных групп в трипсине, ОПТИ и их комплексе при 25°, рН 3,0—6,0, представлены на рис. 4. Экспериментальные результаты изображены в виде зависимостей X от lg(k<sub>0</sub>t). Такой способ представления результатов Н—D-обмена является наиболее подходящим для сравнения данных, полученных при различных рН<sup>(6, 15)</sup>. Кривые на рис. 4, вычерченные в виде штриховых линий, рассчитаны по формуле (1) для гипотетических полипептидов, у которых величина ρ, т. е. вероятность доступности пептидных групп растворителю, указана на рисунке.

Из рис. 4 видно, что самая высокая скорость дейтериеобмена обнаружена у трипсина. В трипсине (рис. 4а) 50% пептидных групп обменивают водородные атомы легче, чем пептидные группы гипотетического полипептида с ρ=10<sup>-1</sup>; для ОПТИ (рис. 4б) такая высокая доступность растворителю (ρ=10<sup>-1</sup>) возможна лишь для 25% пептидных групп. При рН 6,0 количество пептидных групп с незначительной доступностью для обмена (ρ=10<sup>-4</sup>) у трипсина было наименьшее — 20%, у ОПТИ 35%, а у комплексов — более 40%.

Расчеты изменения стандартной свободной энергии (формула (4)) показали, что при рН 6,0 комплекс трипсин — ингибитор имеет достаточно высокое содержание пептидных групп (свыше 35%), для которых ΔG<sup>0</sup>>6 ккал/моль. Для трипсина фракция пептидных групп с ΔG<sup>0</sup>>6 ккал/моль составляла менее 20%. Основная часть пептидных групп трипсина (70%) была защищена от доступности растворителю конформация-

ми с величинами  $\Delta G^0$ , меньшими, чем 4 ккал/моль. Более высокие значения  $\Delta G^0$  для комплекса по сравнению с трипсином указывают на то, что внутренние области белковой молекулы комплекса являются более труднодоступными для Н—D-обмена. При образовании комплекса трипсин — ингибитор часть пептидных групп трипсина, который количественно преобладает в комплексе, становится, по-видимому, менее доступной изотопному растворителю за счет возникновения более плотной структуры и более тесного контакта между ферментом и ингибитором <sup>(16)</sup>.

Из рис. 4а, б видно, что зависимости  $X$  от  $\lg(k_0t)$  для трипсина и ОПТИ представляют более или менее сплошные и переходящие одна в другую кривые, что дает основание делать вывод об отсутствии существенных конформационных изменений в этих белках при рН 3,0—6,0. Отчетливо выраженное смещение кривой для комплекса трипсин — ингибитор при рН 6,0 (рис. 4в) можно интерпретировать как следствие изменения конформации белков комплекса <sup>(6)</sup>.

Относительно пологий характер кривых для трипсина, ОПТИ и их комплекса свидетельствуют о том, что обменный процесс протекает как ряд независимых реакций пептидных групп и что имеется широкое распределение величин  $\rho$  (или  $\Delta G^0$ ) для пептидных групп исследованных белков.

Институт эволюционной физиологии и биохимии  
им. И. М. Сеченова  
Академии наук СССР  
Ленинград  
Институт Эрстеда  
Копенгагенский университет

Поступило  
1 VII 1974

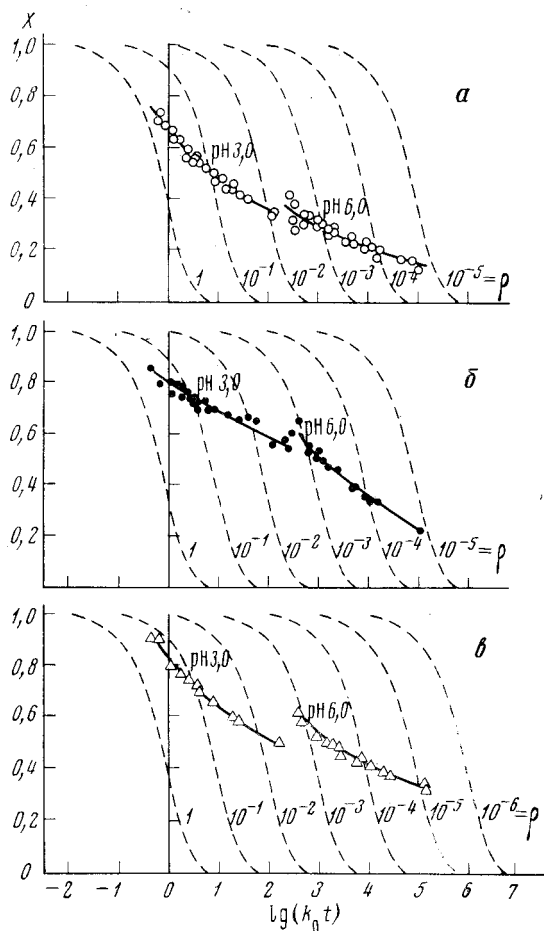


Рис. 4. Данные дейтериевого обмена трипсина (а), ОПТИ (б) и комплекса трипсин — ингибитор (в), представленные как зависимости  $X$  от  $\lg(k_0t)$  при рН 3,0 и рН 6,0 и 25°

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Aa Hvidt, F. H. R. Kägi, C. R. Trav. Lab. Carlsberg, v. 33, 497 (1963).
- <sup>2</sup> M. Ottesen, A. Stracher, *ibid.*, v. 31, 457 (1960).
- <sup>3</sup> D. E. Lenz, W. P. Bryan, *Biochem.*, v. 3, 1123 (1969).
- <sup>4</sup> G. Nonnenmacher, E. Viala et al., *Eur. J. Biochem.*, v. 21, 393 (1971).
- <sup>5</sup> А. Хейдр, С. О. Нильсен, Химия белка, М., 1969.
- <sup>6</sup> Aa Hvidt, Wallevik, *J. Biol. Chem.*, v. 247, № 5, 1530 (1972).
- <sup>7</sup> E. R. Blout, C. de Loze, A. Asadourian, *J. Am. Chem. Soc.*, v. 83, 1895 (1961).
- <sup>8</sup> Aa Hvidt, C. R. Trav. Lab. Carlsberg, v. 33, 475 (1963).
- <sup>9</sup> M. Ottesen, *Methods in Biochemical Analysis*, v. 20, 1971, p. 135.
- <sup>10</sup> D. L. Coleman, L. Willumsen, C. R. Trav. Lab. Carlsberg, v. 37, 1 (1969).
- <sup>11</sup> E. G. Bendit, *Biopolymers*, v. 5, 525 (1967).
- <sup>12</sup> H. Lenormant, E. R. Blout, *Nature*, v. 172, 770 (1953).
- <sup>13</sup> R. Huber, D. Kukla et al., *Naturwiss.*, v. 57, 389 (1970).
- <sup>14</sup> H. Susi, S. N. Timasheff, L. Stevens, *J. Biol. Chem.*, v. 242, 5460 (1967).
- <sup>15</sup> L. Willumsen, C. R. Trav. Lab. Carlsberg, v. 38, 223 (1971).
- <sup>16</sup> F. Chanvet, R. Acher, *Federat. Europ. Biochem. Letters*, v. 2, 17 (1969).