

УДК 547.962:678.01:53

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ  
В ВОДНООРГАНИЧЕСКИХ СМЕСЯХ  
МЕТОДОМ ДИСПЕРСИИ ОПТИЧЕСКОГО ВРАЩЕНИЯ

*В. И. Мерзлов, В. М. Гуревич, Н. В. Гришина,  
А. Б. Зезин, Н. Ф. Бакеев*

В настоящее время опубликовано большое число работ, посвященных изучению поведения белков в смешанных водноорганических растворителях [1—3]. При добавлении к водному раствору белка органического растворителя, не способного эффективно конкурировать за водородные связи с пептидной группой белковой макромолекулы (таких как диметилформамид, диоксан (ДО), этиленгликоль, этиленхлоргидрин (ЭХГ) и др.), повышается доля спиральных конформаций. При достаточно высоких концентрациях органического растворителя процентное содержание аминокислотных остатков белка, имеющих конформацию  $\alpha$ -спирали, может значительно превысить степень спиральности нативной молекулы, что сопровождается существенным повышением устойчивости спиральной конформации [2]. Присутствие органического растворителя в водном растворе белка ослабляет гидрофобное взаимодействие неполярных боковых цепей аминокислотных остатков, стабилизирующих в значительной мере конформацию белковой глобулы [3].

Изучение поведения белков в водноорганических смесях имеет непосредственное отношение к вопросу о природе сил, стабилизирующих нативную форму белка. В настоящей работе сделана попытка проследить влияние третичной структуры яичного альбумина и глобулы человека на устойчивость конформации  $\alpha$ -спирали.

**Экспериментальная часть**

В качестве объектов исследования выбраны типичные глобулярные белки — яичный альбумин (ЯА) и глобула человека. Как известно, в молекуле ЯА имеется одна S—S-связь, которая замыкает небольшой отрезок полипептидной цепи, поэтому не может существенно влиять на стабилизацию глобулы ЯА. В молекуле глобулы вообще не имеется S—S-связей. Стабилизация глобулярной формы этих белков определяется в основном внутрглобулярными гидрофобными взаимодействиями. ЯА выделяется по известной методике с последующей трехкратной перекристаллизацией из насыщенного раствора сернокислого аммония. Нативный глобула человека получен по методу Росси-Фанелли [4] в лаборатории фракционирования белков ЦОЛИПК\*. Органические растворители ЭХГ и ДО очищали известными методами [5]. Растворы белков исследовали методом дисперсии оптического вращения (ДОВ). Измерения проводили на спектрополяриметре Jasco ORD / UV-5 в области длин волн от 550 до 300  $\text{мкм}$  в терmostатированных кюветах длиной 0,1, 0,2 и 1,0  $\text{дм}$ . Анализ данных ДОВ проводили в соответствии с уравнением Моффита — Янга, полагая  $\lambda_0 = 212$  и  $b_0 = -630 \text{ мкм}$  для конформации  $\alpha$ -спирали.

\* Авторы выражают благодарность Г. Я. Розенбергу и М. М. Рудашевской за любезно предоставленные препараты нативного глобулы.

## Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлена зависимость параметров  $a_0$  и  $b_0$  в растворах ЯА в фосфатном буфере ( $\text{pH} = 9,4$ ,  $\mu = 0,1$ ) от состава растворителя. В качестве растворителя использовали воднодиоксановые смеси. Можно видеть, что в растворах, содержащих менее 12% \* ДО не происходит заметных изменений параметров  $a_0$  и  $b_0$ . Это указывает на отсутствие изменения конформации молекул ЯА. При дальнейшем увеличении содержания ДО в растворе наблюдается уменьшение степени спиральности белка. Введение еще больших количеств ДО приводит к быстрому возрастанию параметра  $b_0$  (имеется в виду  $|b_0|$ ), что характерно для образования

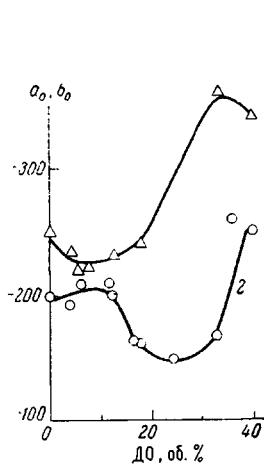


Рис. 1

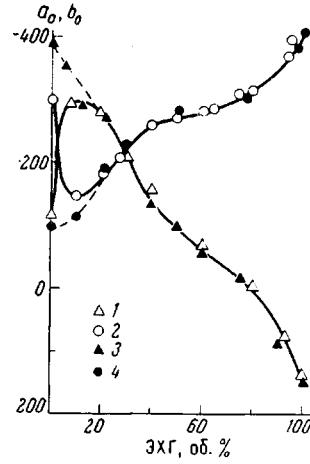


Рис. 2

Рис. 1. Изменение параметров уравнения Мэффита — Янга в воднодиоксановых растворах ЯА в зависимости от состава растворителя

$c = 0,09—0,12 \text{ г}/100 \text{ мл}$  раствора;  $\text{pH} = 9,4$  (водный раствор, фосфатный буфер);  $\mu = 0,1$ ; 1 —  $a_0$ ; 2 —  $b_0$

Рис. 2. Изменение параметров уравнения Мэффита — Янга в водноэтиленхлоридриновых растворах нативного и денатурированного глобина человека в зависимости от состава растворителя

$c = 0,07—0,3 \text{ г}/100 \text{ мл}$  раствора. Нативный глобин человека,  $\text{pH} = 6,3—6,5$  (водный раствор, фосфатный буфер); 1 —  $a_0$ , 2 —  $b_0$ . Денатурированный глобин,  $\text{pH} = 4,0—5,0$  (водный раствор); 3 —  $a_0$ , 4 —  $b_0$ .

правой  $\alpha$ -спирали. Причем, при содержании ДО 40% значение  $b_0$  выше, чем для белка в водном растворе, т. е. степень спиральности выше, чем для нативного белка. Это соответствует поведению ЯА в смесях воды и ЭХГ, содержащих большие количества ЭХГ [2, 6].

Аналогичные эксперименты были проведены нами с растворами нативного глобина человека в смесях воды и ЭХГ. Результаты измерения ДОВ этих растворов приведены на рис. 2. Можно видеть, что в водном растворе ( $\text{pH} = 6,3$ ,  $\mu = 0,1$ , фосфатный буфер) степень спиральности этого белка составляет 45%, что согласуется с величинами, полученными ранее [7, 8]. Как видно из рис. 2, добавление в водный раствор этого белка уже небольших количеств органического растворителя приводит к существенному понижению степени спиральности, о чем свидетельствуют изменения параметров уравнения Мэффита — Янга. При этом  $b_0$  изменя-

\* Когда речь идет о процентном составе растворителя, всегда имеют в виду объемные проценты.

ется от  $-300$  в водном растворе до  $-150$  при содержании ЭХГ  $10\%$ , а  $a_0$  изменяется от  $-115$  до  $-300$ . По мере дальнейшего увеличения концентрации ЭХГ в растворе наблюдается монотонное изменение дисперсионных параметров, которые в чистом ЭХГ имеют значения:  $b_0 = -410$ ,  $a_0 = 150$ . Эти значения соответствуют  $75\%$  степени спиральности и совпадают с полученными ранее [9].

Уменьшение степени спиральности нативного глобина при добавлении небольших количеств ЭХГ, очевидно, связано с разрушением нативной структуры, а не с влиянием ЭХГ на вращательную способность белка как таковую, так как для водных растворов денатурированного глобина (фракция, нерастворимая при  $\text{pH} = 6-7$ ), содержащих малые количества ЭХГ,

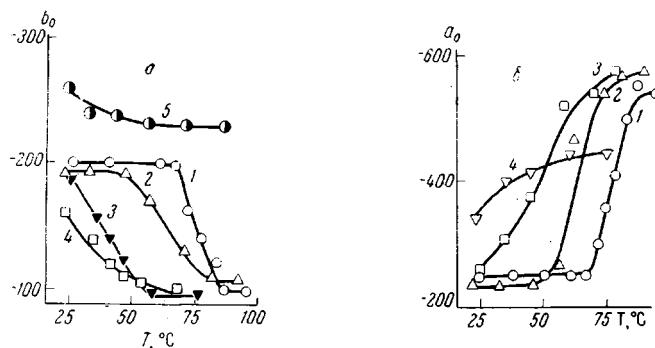


Рис. 3. Зависимость параметров  $b_0$  (а) и  $a_0$  (б) от температуры в растворах ЯА, различного состава (вода — ДО):  
 $c = 0,09-0,12 \text{ г}/100 \text{ мл}$  раствора; 1 — вода,  $\text{pH} = 9,4$ ,  $\mu = 0,1$ ; 2 — 3,8; 3 — 12,4; 4 — 18,0 (а) и 40,0 (б); 5 — 36,0% ДО

наблюдается противоположная картина. Добавление ЭХГ к водному раствору денатурированного глобина сразу вызывает изменение параметров ДОВ, соответствующее возрастанию степени спиральности белка (рис. 2). Начиная с концентрации  $20\%$  дальнейшее увеличение содержания ЭХГ в растворе вплоть до  $100\%$  не позволяет различить поведение нативного и денатурированного белков. Значения  $a_0$  и  $b_0$  в этом интервале концентраций ЭХГ в обоих случаях практически совпадают.

Из рис. 4 видно, что введение в раствор ЯА  $12\%$  ДО не вызывает существенного изменения параметров  $a_0$  и  $b_0$  по сравнению с водным раствором. Однако можно предположить, что органический растворитель проникает в глобулу белка даже при меньших концентрациях ДО в растворе и влияет на устойчивость  $\alpha$ -спирали, так как вторичная структура в определенной степени стабилизируется наличием компактной глобулярной третичной структуры [3]. В связи с этим была изучена термическая устойчивость вторичной структуры ЯА в воднодиоксановых смесях различного состава.

В водном растворе ЯА плавление  $\alpha$ -спирали описывается S-образной кривой, на что указывает зависимость параметров  $a_0$  и  $b_0$  от температуры, и происходит в интервале температур  $70-85^\circ$ . В растворах, содержащих менее  $25\%$  ДО, характер зависимости параметров ДОВ от температуры не изменяется, однако по мере увеличения концентрации ДО от  $0$  до  $25\%$  область перехода расширяется и смещается в сторону более низких температур. На рис. 3 приведены типичные кривые зависимости параметров ДОВ от температуры для некоторых воднодиоксановых растворов белка. На рис. 4 изображена зависимость величины  $T_{\text{пл}}$  (которая на графиках зависимости  $a_0$  и  $b_0$  от температуры соответствует температуре середины перехода) от содержания ДО в растворе. Как видно из рисунка,  $T_{\text{пл}}$  для ЯА падает с увеличением концентрации ДО в растворе, достигая ми-

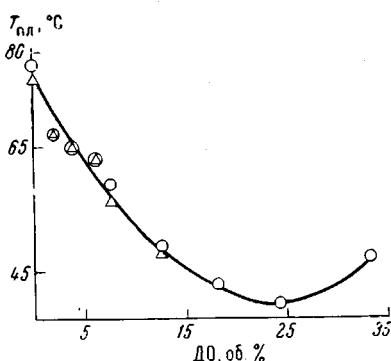


Рис. 4. Зависимость температуры плавления  $T_{\text{мел}}$  спиральной структуры ЯА от содержания ДО в водных растворах белка

стков, имеющихся в нативных молекулах этих белков. Однако, если рассматривать взаимодействие  $\alpha$ -спиральных участков, не включенных в третичную или четвертичную структуры с малополярными органическими растворителями, то степень спиральности должна увеличиваться в их присутствии или, по крайней мере, не меняться [10]. Действительно,  $\alpha$ -спираль стабилизирована внутримолекулярными водородными связями, энергия которых сравнима с энергией водородных связей между пептидной группой и водой. Добавление в такую систему малополярного органического растворителя, не способного конкурировать за водородные связи с пептидной группой, приводит (начиная с некоторой концентрации этого растворителя) к увеличению степени спиральности, так как равновесие реакции образования водородных связей в пределах единичной цепи и между пептидными группами и растворителем сдвигается в сторону внутримолекулярных. Подобные представления [3, 11] не объясняют разрушающего действия органических растворителей в малых концентрациях на вторичную структуру ЯА и нативного глобина человека. Однако данные, полученные нами при исследовании денатурированного глобина (имеющего низкую степень спиральности), свидетельствуют о том, что изменение степени спиральности при добавлении в водный раствор этого белка ЭХГ происходит в соответствии с изложенными выше представлениями. Изменение параметров  $a_0$  и  $b_0$  в этом случае указывает на увеличение степени спиральности белка при добавлении в раствор уже небольших количеств ЭХГ (рис. 2).

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что компактная глобулярная структура нативной молекулы белка в водном растворе стабилизирует спиральную конформацию отдельных участков полипептидной цепи. Такое предположение хорошо подтверждается результатами изучения термической устойчивости спиральной конформации ЯА в воднодиоксановых растворах. Особый интерес представляют данные о температуре плавления вторичной структуры ЯА в области малых концентраций ДО, когда, судя по данным ДОВ, не происходит заметных изменений структуры белка. Эти результаты представлены на рис. 1 и 4. Как видно из рис. 4, устойчивость  $\alpha$ -спирали заметно падает при добавлении органического растворителя уже в количестве 2% и минимальна при концентрации ДО, соответствующей минимуму степени спиральности ЯА. Это, очевидно, связано с изменениями в третичной структуре, так как параметр  $b_0$ , характеризующий вторичную структуру, остается неизменным в этом интервале концентраций ДО (рис. 1), а действие органического растворителя должно было бы, в принципе, повышать устойчивость конформации  $\alpha$ -спирали. Можно думать при этом, что орга-

нимального значения, когда концентрация ДО соответствует минимуму степени спиральности белка. При более высоких концентрациях ДО  $T_{\text{мел}}$  увеличивается. Нам не удалось измерить  $T_{\text{мел}}$  при содержании ДО выше 40%, так как параметр  $b_0$  в этих случаях практически не менялся при изменении температуры, что, очевидно, связано с известным фактом повышения устойчивости  $\alpha$ -спирали в неполярных растворителях [2].

Полученные результаты (рис. 1 и 2) показывают, что как в случае ЯА, так и в случае глобина человека добавление определенных количеств органического растворителя вызывает разрушение большей части спиральных участков, имеющихся в нативных молекулах этих белков. Однако, если рассматривать взаимодействие  $\alpha$ -спиральных участков, не включенных в третичную или четвертичную структуры с малополярными органическими растворителями, то степень спиральности должна увеличиваться в их присутствии или, по крайней мере, не меняться [10]. Действительно,  $\alpha$ -спираль стабилизирована внутримолекулярными водородными связями, энергия которых сравнима с энергией водородных связей между пептидной группой и водой. Добавление в такую систему малополярного органического растворителя, не способного конкурировать за водородные связи с пептидной группой, приводит (начиная с некоторой концентрации этого растворителя) к увеличению степени спиральности, так как равновесие реакции образования водородных связей в пределах единичной цепи и между пептидными группами и растворителем сдвигается в сторону внутримолекулярных. Подобные представления [3, 11] не объясняют разрушающего действия органических растворителей в малых концентрациях на вторичную структуру ЯА и нативного глобина человека. Однако данные, полученные нами при исследовании денатурированного глобина (имеющего низкую степень спиральности), свидетельствуют о том, что изменение степени спиральности при добавлении в водный раствор этого белка ЭХГ происходит в соответствии с изложенными выше представлениями. Изменение параметров  $a_0$  и  $b_0$  в этом случае указывает на увеличение степени спиральности белка при добавлении в раствор уже небольших количеств ЭХГ (рис. 2).

нический растворитель при небольшом содержании его в водном растворе белка не распределяется равномерно по объему, а проникает преимущественно в гидрофобное ядро глобулы, ослабляя внутрглобулярные взаимодействия. Это предположение вполне разумно, ибо хорошо известно явление повышения растворимости в воде малорастворимых углеводородов в присутствии детергентов (выше критической концентрации мицеллообразования) и белков. Полагают, что растворимость углеводородов в этом случае повышается за счет проникновения их в гидрофобные области мицелл. Добавление в водные растворы детергентов органического растворителя, смешивающегося с водой, вызывает при определенной концентрации разрушение мицелл [12]. Аналогичная картина, по-видимому, имеет место и в нашем случае. Тогда, если спиральная конформация отдельных участков полипептидной цепи белка стабилизируется не только внутримолекулярными водородными связями, но и гидрофобными взаимодействиями внутри глобулы, то прогрессивное ослабление этих взаимодействий неизбежно будет приводить к уменьшению устойчивости  $\alpha$ -спирали, т. е. к уменьшению температуры плавления  $T_{\text{пл}}$  вторичной структуры белка, что и видно на рис. 4.

### Выводы

1. Методом дисперсии оптического вращения исследованы конформационные превращения в водоорганических смесях глобулярных белков на примере яичного альбумина (ЯА) и глобула человека.

2. Показано, что введение сравнительно небольших количеств диоксана (ДО) в водные растворы ЯА не приводит к изменению конформации белка. Дальнейшее увеличение концентрации органического растворителя приводит сначала к понижению степени спиральности белка, а затем степень спиральности увеличивается. Подобные результаты получены при исследовании растворов нативного глобула человека в смесях воды и этиленхлоргидрина (ЭХГ).

3. На примере ЯА обнаружено, что в присутствии небольших количеств ДО в водном растворе белка, не вызывающих конформационных изменений, устойчивость спиральной конформации понижается.

4. Полученные результаты свидетельствуют о том, что спиральная конформация нативных глобулярных белков стабилизирована третичной структурой.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию  
28 XI 1968

### ЛИТЕРАТУРА

1. S. J. Singer, *Advances Protein Chem.*, **17**, 1, 1962.
2. С. Е. Бреслер, В. П. Кушнер, С. Я. Френкель, *Биохимия*, **24**, 685, 1959.
3. О. Б. Птицын, *Усп. совр. биологии*, **63**, 3, 1967.
4. A. Rossi-Fanelli, E. Antonioni, *Biochim. et biophys. acta*, **30**, 608, 1958.
5. А. Вайсбергер, Э. Проскауэр, Дж. Риддик, Э. Типс, *Органические растворители*, Изд-во иностр. лит., 1958.
6. В. П. Кушнер, С. Я. Френкель, *Биохимия*, **27**, 1111, 1962.
7. T. Asakura, S. Minakami, Y. Yoneuama, H. Yoshikawa, *J. Biochem.*, **56**, 594, 1964.
8. Z. Hrkáč, Z. Vodrážka, *Biochim. et biophys. acta*, **133**, 527, 1967.
9. P. Urnes, P. Doty, *Advances Protein Chem.*, **16**, 401, 1961.
10. C. Tanford, P. K. De, V. G. Taggart, *J. Amer. Chem. Soc.*, **82**, 6028, 1960; C. Tanford, C. E. Buckley III, P. K. De, E. P. Lively, *J. Biol. Chem.*, **237**, 1168, 1962.
11. Т. М. Бирштейн, О. Б. Птицын, *Конформация макромолекул*, изд-во «Наука», 1964.
12. К. Шинода, Т. Накагава, Б. Тамамуси, Т. Исемура, *Коллоидные поверхностиактивные вещества*, изд-во «Мир», 1966.

**STUDIES OF SOME GLOBULAR PROTEINS IN AQUEOUS-ORGANIC  
MIXTURES BY MEANS OF DISPERSION OF OPTICAL ROTATION**

**V. P. Merzlov, V. M. Gurevich, N. V. Grishina, A. B. Zezin,  
N. F. Bakeev**

**S u m m a r y**

By means of dispersion of optical rotation conformational transitions of globular proteins in aqueous-organic mixtures have been studied on the example of ovalbumin and human globin. Introduction of relatively small amounts of dioxane in aqueous solutions of ovalbumin does not change the protein conformation. Further increase of its concentration firstly decreases and then increases helicity of the protein. Similar results have been obtained for solvents of native human globin in mixtures of water and ethylenechlorohydrin. On the example of ovalbumin it has been shown that minor amounts of dioxane not causing conformation changes decrease stability of helical conformation. The results point out that helical conformation of native globular proteins is stabilized with the tertiary structure.