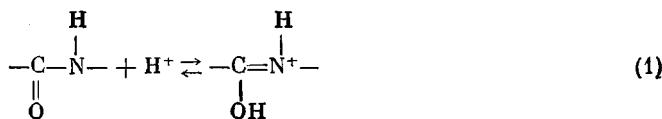


УДК 678.01:53:678.675

РОЛЬ ВОДОРОДНОЙ СВЯЗИ В ПЕРЕХОДАХ УПОРЯДОЧЕННАЯ
СТРУКТУРА — КЛУБОК В ПОЛИПЕТИДАХ ПРИ ДЕЙСТВИИ
СИЛЬНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

Б. З. Волчек, А. В. Пуркина

Известно, что дихлоруксусная (ДХУ) и трифтормуксусная (ТФУ) кислоты являются сильными денатурирующими агентами для большинства полипептидов. В работе [1] денатурирующее действие сильных кислот было объяснено разрывом внутри- или межмолекулярных водородных связей полипептид — полипептид и образованием водородных связей полипептид — кислота; действие кислоты может быть объяснено реакцией протонизации пептидных групп по схеме



В результате этой реакции возникает электростатическое отталкивание между пептидными группами, приводящее к переходу порядок — беспорядок [2]. Вторая точка зрения, казалось, подтверждается данными, полученными методом ЯМР, по изучению действия добавок кислот на растворы N-метилацетамида [3] и N-метилпропионамида [4], а также результатами, полученными в работе [5]. В этой работе методом ИК-спектров поглощения в обертонной области исследовался переход спираль — клубок в полигамма-бензил-L-глутамате (П- γ -БГ), поли-L-аланине (П-L-A) и поли-L-лейцине (П-L-L) под действием ТФУ- и ДХУ-кислот.

Ранее нами [6] методом ИК-спектров поглощения в области 1400—1800 cm^{-1} на ряде полипептидов было показано, что добавление ДХУ- и ТФУ-кислот к растворам этих веществ приводит к частичной протонизации пептидной группы. Однако доля протонизированных групп мала. В связи с этим было высказано предположение, что основной причиной перехода полипептидов из упорядоченного состояния в клубок является разрыв водородных связей полимер — полимер и образование связей полимер — кислота. В настоящей работе приводятся дополнительные данные, подтверждающие это предположение. Работа проводилась на приборе UR-10. Методика эксперимента описана в работе [6].

В таблице приведены данные о максимальной степени протонизации пептидных групп при добавлении в растворы ряда полипептидов внейтральном растворителе ТФУ- и ДХУ-кислот.

Расчет степени протонизации проводился по полосе поглощения COO-групп кислоты — 1620 cm^{-1} . Коэффициент поглощения этих групп рассчитывался из значения степени диссоциации кислоты в воде при известном разбавлении. Этот коэффициент оказался приблизительно одного порядка с коэффициентом поглощения полосы амид-1, что обеспечивает достаточно высокую точность в определении доли протонизированных групп. Как видно из таблицы, степень протонизации П- γ -БГ, П- γ -МГ, ПАС,

ПКБМЦ не превышает 25 %. Другой характерной особенностью является то, что протонизация пептидных групп наблюдается уже при незначительных добавках кислоты в раствор полипептида ($\sim 1\%$ ТФУ-кислоты по объему для П- γ -БГ, П- γ -МГ) и достигает максимального значения задолго до начала конформационного перехода (см. таблицу). Приведенные данные свидетельствуют о том, что протонизация не может являться основной причиной перехода порядок — беспорядок в полипептидах под действием сильных органических кислот.

Степень протонизации полипептидов

Полипептид	Максимальная степень протонизации, %	Концентрация кислоты, соответствующая максимальной престинзии, %	Концентрация кислоты, соответствующая началу конформационного перехода по ДОВ, %
П- γ -БГ	~ 25	ТФУ — 15	25—30
П- γ -МГ *	~ 25	ТФУ — 15	25
ПОАС **	~ 25	ДХУ — 12	35
ПКБМЦ ***	~ 25	ДХУ — 1	5
П-L-Л	~ 45	ТФУ — 60	50

* Поли- γ -метил-L-глутамат. ** Поли-O-ацетил-L-серин. *** Поли-S-карбобензоксиметил-L-цистеин.

Интересным является тот факт, что в П-L-Л протонизовано 45 % пептидных групп. Вероятно, в этом полипептиде электростатические взаимодействия пептидных групп вносят определенный вклад в переход спираль — клубок. Следует отметить, что в П-L-Л и характер перехода, определенный по дисперсии оптического вращения (ДОВ), отличен от переходов в других полипептидах [7]. Это проявляется в неравенстве нулю параметра b_0 , характеризующего степень спиральности полимера, даже для растворов П-L-Л в чистой ТФУ-кислоте. В отличие от данных, полученных методом ДОВ по ИК-спектрам, наблюдается полный переход α -спиральной конформации П-L-Л в клубок. Однако интервал концентраций ТФУ-кислот, соответствующих переходу, несколько сдвинут по сравнению с интервалом перехода, получаемым по ДОВ: по ИК-спектрам — 60—80 % ТФУ-кислоты, по ДОВ — 40—60 %. С точки зрения развиваемого выше представления о роли водородных связей в переходах порядок — беспорядок в полипептидах интересно было проследить роль некоторых добавок, таких, как вода, некоторые соли, формамид, на конформационный переход в полипептидах. Известно, что добавление 2—3 % воды по объему в раствор П- γ -БГ в ДХУ-кислоте приводит к переходу клубок — спираль. Некоторые авторы [2] полагают, что введение подобных добавок приводит к смещению равновесия реакции (1) в сторону подавления протонизации, а следовательно, и к уменьшению электростатического отталкивания между пептидными группами.

Метод ИК-спектров поглощения позволил нам непосредственно проследить за механизмом действия таких добавок.

На рис. 1 представлены ИК-спектры поглощения амида муравьиной кислоты (HCON HCH_3). Колебание амид-1 в спектре концентрированного раствора этого вещества характеризуется полосой поглощения 1665 cm^{-1} (кривая 1). В спектре амида, разбавленного хлороформом до концентрации 1,2 %, полоса амид-1 лежит при 1690 cm^{-1} (кривая 2). Эта частота соответствует колебаниям свободных C=O -групп. При добавлении в разбавленный раствор амида 12 % муравьиной кислоты появляется новая полоса 1670 cm^{-1} (кривая 3), которая может быть отнесена к колебаниям C=O -групп амида, связанных водородной связью с COOH -группами кислоты. Добавление в раствор амида, содержащий 12 % кислоты, безводного карбоната натрия

(Na_2CO_3) [0,1 моль Na_2CO_3 / 1 моль кислоты] приводит к тому, что вновь появляется полоса 1690 cm^{-1} (кривая 4).

На рис. 2 представлены ИК-спектры карбобензоксидиглицина (*Z*-диглицина). Это вещество нерастворимо в нейтральных растворителях без добавок кислот, и в этом случае нельзя наблюдать полосу колебаний свободных $\text{C}=\text{O}$ -групп. Однако и здесь добавление Na_2CO_3 к раствору *Z*-диглицина в ТФУ-кислоте приводит к смещению полосы 1650 cm^{-1} (кривая 1), относящейся к колебаниям $\text{C}=\text{O}$ -групп, связанных водородной связью с COOH -

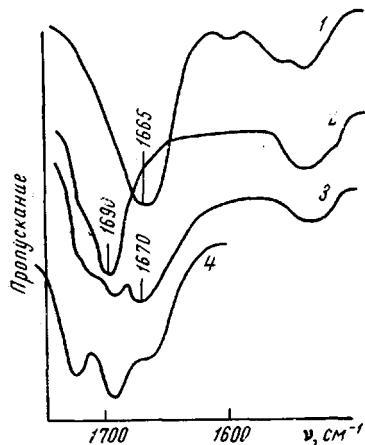


Рис. 1

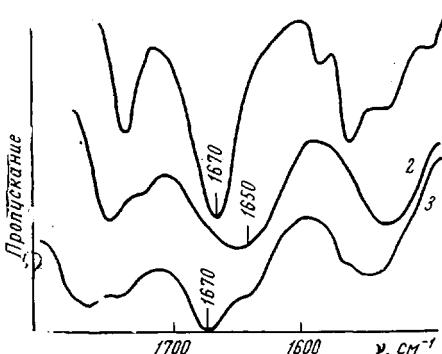


Рис. 2

Рис. 1. ИК-спектры поглощения растворов амида муравьиной кислоты в хлороформе, концентрация 30 (1) и 1,2% (2); в смеси 12% муравьиной кислоты + 88% хлороформа (3) и смеси муравьиная кислота — хлорформ — сода (Na_2CO_3) (4)

Рис. 2. ИК-спектры поглощения *Z*-диглицина:

1 — таблетки с KBr; 2 — раствор в ТФУ-кислоте; 3 — то же с содой (Na_2CO_3)

группами кислоты, в область 1670 cm^{-1} (кривая 3). Полоса 1670 cm^{-1} характерна для межмолекулярной связи пептид — пептид (кривая 1). Нужно отметить, что через 1,5 часа диглицин выпадает из раствора, содержащего Na_2CO_3 .

Из приведенных выше данных следует, что действие некоторых добавок, обладающих ренатурирующими свойствами для ряда полипептидов, вероятно, заключается в разрыве водородной связи пептид — кислота и образовании такой связи между добавкой и кислотой.

К сожалению, полипептиды, образующие межмолекулярные водородные связи (β -структура), не растворяются в нейтральных растворителях, в полипептидах же с α -спиральной конформацией эти связи носят внутримолекулярный характер. Это не позволяет, как в случае амида муравьиной кислоты, непосредственно следить за пептидной группой в присутствии ренатурирующих добавок. Однако этот процесс может быть косвенно изучен на примере $\text{C}=\text{O}$ -групп боковых цепей полипептидов. Можно предполагать, что акцепторные свойства $\text{C}=\text{O}$ -групп, расположенных в боковых цепях, по отношению к кислоте больше, чем те же свойства $\text{C}=\text{O}$ пептидной группы.

При добавлении 1% ТФУ-кислоты к раствору Π - γ -БГ в хлороформе в спектре наряду с полосой 1735 cm^{-1} , характеризующей колебания свободных $\text{C}=\text{O}$ -групп боковой цепи, появляется полоса 1710 cm^{-1} , относящаяся к колебаниям указанных $\text{C}=\text{O}$ -групп, связанных водородной связью с COOH -группами кислоты (рис. 3, кривая 1). При увеличении концентрации ТФУ-кислоты интенсивность полосы 1735 cm^{-1} уменьшается, а полосы 1710 — увеличивается. При содержании ТФУ-кислоты в растворе $\sim 20\%$

интенсивности указанных полос становятся практически равными (рис. 3, кривая 2).

Как уже отмечалось [2], присутствие воды в кислоте оказывает сильное ренатурирующее воздействие на полипептиды. Однако наблюдение за действием воды в растворах полипептидов П- γ -БГ и П- γ -МГ в хлороформе, содержащих небольшое количество кислоты, например ТФУ, затруднено из-за плохой растворимости воды в смеси хлороформ — кислота. Поэтому в качестве агента, моделирующего воду, был взят метанол. Известно [8], что добавление 13% метанола в раствор П- γ -МГ в ТФУ-кислоте приводит к конформационному переходу клубок — спираль. Высаждение полипептида происходит при содержании метанола в растворе $\sim 50\%$.

На рис. 3, кривая 3 приведен ИК-спектр поглощения П- γ -БГ в смеси 20% ТФУ — 6% метано-

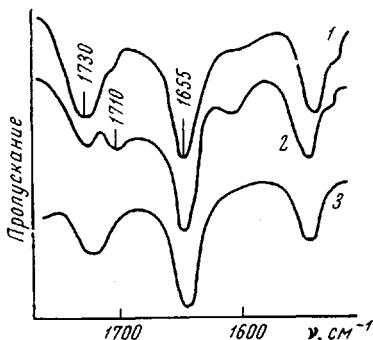


Рис. 3. ИК-спектры поглощения растворов П- γ -БГ:

1 — 1% ТФУ-кислоты — хлороформ,
2 — 20% ТФУ-кислоты — хлороформ,
3 — 20% ТФУ-кислоты — 6% метано-
ла — хлороформ

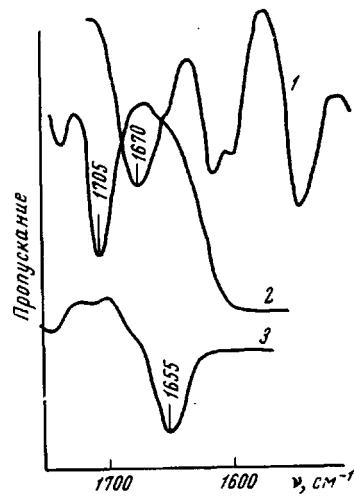


Рис. 4. ИК-спектры поглощения n-Cl-ацетанилида:

1 — таблетки с КВг; 2 — раствор в четыреххлористом углероде, концентрация 0,002 M; 3 — раствор в смеси муравьиной кислоты — четыреххлористый углерод

ла — хлороформ. Как видно из рис. 3, добавление метанола приводит практически к полному исчезновению полосы 1710 cm^{-1} , при этом интенсивность полосы 1735 cm^{-1} увеличивается. Эти данные свидетельствуют о том, что водородная связь кислота — полипептид разрывается, и С=O-группы боковой цепи становятся свободными. Следует отметить, что добавление метанола вызывает также исчезновение полосы 1620 cm^{-1} , связанной с протонизацией пептидных групп. Таким образом, и в случае полипептидов действие ренатурирующих добавок может быть объяснено их конкуренцией в системе водородных связей полимер — кислота.

В связи с этим встает вопрос о степени взаимодействия кислоты с полипептидом. В работе [9] на примере простых амидов показано, что донорно-акцепторные свойства С=O- и N—H-групп амидной группы различны. В то время как С=O-группы образуют водородные связи с кислотами, N—H остаются практически свободными. На рис. 4, кривая 2 представлен спектр n-Cl-ацетанилида Cl-C(=O)c1ccccc1N(C)C в четыреххлористом углероде при концентрации 0,002 M. Смещение полосы поглощения С=O-групп с 1670 cm^{-1} (таблетка в КВг; рис. 4, кривая 1) в положение 1705 cm^{-1} в спектре раствора указывает на то, что полоса 1705 cm^{-1} (кривая 2) относится к колебаниям свободных С=O-групп. При добавлении в такой раствор ТФУ-кислоты интенсивность полосы 1705 cm^{-1} убывает и появляется полоса 1655 cm^{-1} (кривая 3), которую можно отнести к колебаниям

$\text{C}=\text{O}$ -групп, связанных водородной связью с кислотой. При концентрации кислоты в 8 раз большей, чем концентрация анилида, полоса 1705 cm^{-1} почти полностью исчезает (рис. 4, кривая 3). Это свидетельствует о том, что практически все $\text{C}=\text{O}$ -группы анилида при такой концентрации кислоты связаны с ней водородной связью. Следует отметить, что $\text{N}-\text{H}$ -группы анилида при этом остаются свободными. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в случае простых амидов практически все $\text{C}=\text{O}$ -группы способны вступать в водородную связь с кислотой.

Более сложным для экспериментальной проверки является вопрос о количестве пептидных групп, способных образовывать водородные свя-

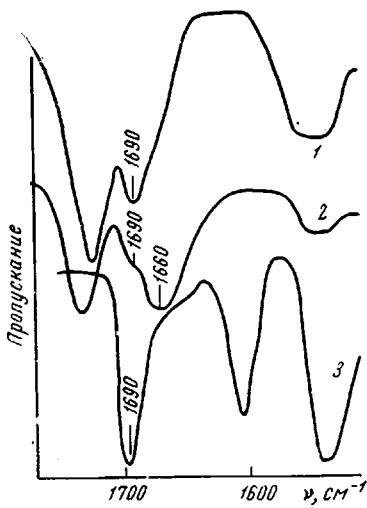


Рис. 5. ИК-спектры поглощения разбавленных растворов в диметилсульфоксиде:
1 — Z-диглицина; 2 — II- γ -Б-*dl*-Г;
3 — *n*-Cl-ацетанильда

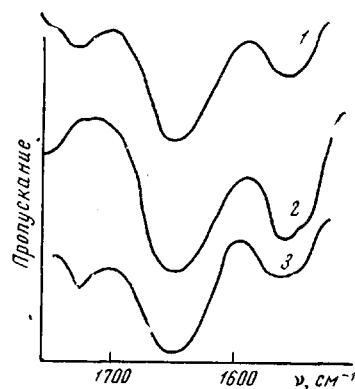


Рис. 6. ИК-спектры поглощения растворов:
1 — II- γ -БГ в 80% ДХУ — хлороформ; 2 — II-КВМЦ в 12% ДХУ — хлороформ; 3 — II-L-Л в 80% ТФУ — хлороформ

зи с кислотой в полипептидах. Это связано с тем, что для полипептидов в инертном растворителе невозможно определить положение свободных $\text{C}=\text{O}$ -групп пептидной связи. Для того чтобы определить частоту этого колебания, были сняты ИК-спектры поглощения Z-диглицина и карбобензокситетраглицина (Z-тетраглицин) в диметилсульфоксиде (ДМСО). Этот растворитель рвет связи $\text{C}=\text{O} \dots \text{H}-\text{N}$, образуя связи $\text{S}=\text{O} \dots \text{H}-\text{N}$.

На рис. 5, кривая 1 представлен ИК-спектр поглощения разбавленного раствора Z-диглицина в диметилсульфоксиде. Вместо полосы 1670 cm^{-1} , наблюдаемой в спектре этого вещества в твердом состоянии, появляется полоса 1690 cm^{-1} , которую, учитывая малую концентрацию вещества в растворе, можно отнести к $\text{C}=\text{O}$ свободным валентным колебаниям. Аналогичные результаты получаются и в случае тетраглицина. Следует отметить, что и для поли- γ -бензил-*dl*-глутамата в диметилсульфоксиде (рис. 5, кривая 2), наряду с полосой 1660 cm^{-1} , характеризующей колебания $\text{C}=\text{O}$ -групп, связанных внутримолекулярной водородной связью с $\text{N}-\text{H}$ -группами, также появляется полоса 1690 cm^{-1} , относящаяся к свободным колебаниям $\text{C}=\text{O}$ пептидных групп.

Таким образом, полоса 1690 cm^{-1} наблюдается для свободных колебаний $\text{C}=\text{O}$ -групп как в простых пептидах, так и в полипептидах в растворах в диметилсульфоксиде. Влияние растворителя было учтено сравнением положения этой полосы поглощения свободных колебаний $\text{C}=\text{O}$ для *n*-Cl-ацетанильда в интересующей нас смеси хлороформ — кислота и диметилсульфоксиде. Оказалось, что в то время как колебание свободных $\text{C}=\text{O}$ -групп в смеси хлороформ — кислота лежит в области 1705 cm^{-1} , частота указанного колебания в диметилсульфоксиде, так же как для пептидов и

для полипептидов, лежит у 1690 см^{-1} . Поэтому можно думать, что в интересующей нас смеси растворителей (инертный растворитель — кислота) наличие свободных C=O-групп в полипептидах должно характеризоваться поглощением в области 1700 см^{-1} . На рис. 6 представлены ИК-спектры ряда полипептидов: П- γ -БГ, ПКБМЦ, П-L-Л в смеси хлороформ — кислота при концентрации кислоты, соответствующей клубковой конформации. Как видно из рис. 6, в области 1700 см^{-1} нет полос поглощения, что, вероятно, свидетельствует о практически полном связывании пептидных групп с кислотой при переходе полипептида из упорядоченного состояния в клубок.

Выводы

1. На примере ряда полипептидов показано, что действие на них трифторуксусной и дихлоруксусной кислот приводит к незначительной протонизации пептидной группы. Поэтому образование водородных связей полипептид — кислота является, вероятно, одной из главных причин конформационного перехода в полипептидах.

2. Ренатурационное действие некоторых добавок, таких, как вода и соли, связано с разрывом водородной связи кислота — полипептид и образованием водородной связи кислота — добавка.

3. При переходе порядок — беспорядок в полипептидах практически все C=O-группы связываются с кислотой.

Институт высокомолекулярных
соединений АН СССР

Поступила в редакцию
8 VII 1968

ЛИТЕРАТУРА

1. E. Blout, P. Doty, J. Yang, J. Amer. Chem. Soc., **78**, 498, 1956.
2. А. Б. Зезин, Н. Ф. Бакеев, О. А. Алексина, Докл. АН СССР, **172**, 889, 1967.
3. I. M. Klotz, S. F. Russo, S. Hanlon, M. A. Stake, J. Amer. Chem. Soc., **86**, 4774, 1964.
4. H. Pivcová, Collection, **30**, 2468, 1965.
5. S. Hanlon, I. M. Klotz, Biochemistry, **4**, 37, 1965.
6. Е. З. Волчек, А. В. Пуркина, Высокомолек. соед., А9, 1257, 1967.
7. G. D. Fasman, Polyamino Acids, Poly peptides and Proteins, Univ. Wisc. Press, 1962, p. 221.
8. A. Nakajima, T. Hayashi, Reports on progress in polymer physics in Japan, v. 10, 59, 1967.
9. C. G. Cannon, Microchim. acta, **2**, 555, 1955.

ROLE OF HYDROGEN BONDS IN TRANSITIONS ORDERED STRUCTURE—COIL IN POLYPEPTIDES AT ACTION OF STRONG ORGANIC ACIDS

B. Z. Volchek, A. V. Purkina

Summary

At action of strong organic acids on polypeptides the part of protonated peptide groups is small. One of the main reasons of the conformational transition is rising of hydrogen bonds polypeptide-acid. In coil practically all C=O groups of peptide chain are bound by hydrogen bonds with acid. Renaturating effect of water and salts are expounded with their competing interaction in system of hydrogen bonds between polypeptide and acid.