

УДК 541(64+8):678.675

**ИЗУЧЕНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ ПЕРЕХОДОВ  
ВБЛИЗИ ТОЧКИ ОСАЖДЕНИЯ ПОЛИПЕТИДА ИЗ РАСТВОРА**

**A. Б. Зезин, В. А. Касацкин, Н. Ф. Бакеев**

Наиболее полно в настоящее время изучены конформационные переходы синтетических моделей белков — полипептидов. Как известно, полипептиды в растворе могут существовать в одной из двух стабильных конформаций: конформации статистического клубка и конформации *α*-спирали. Изменением ряда факторов, например температуры раствора, состава растворителя, концентрации полипептида, можно реализовать ту или иную конформацию. Как правило, конформационные переходы изучаются в гомогенных системах и характеризуются необходимой для конформационных изменений концентрацией спирализующего агента. Представляет интерес изучение конформационных переходов вблизи точки осаждения полимера из раствора. В данной работе сделана попытка исследовать конформационный переход вблизи точки осаждения полипептида из раствора на примере поли-*L*-лейцина в смесях трифторуксусной кислоты и воды.

В работе использовали высокомолекулярные образцы поли-*L*-лейцина (ПЛ) и поли-*L*-аланина (ПА), синтезированные фирмой «Light». Примененную в качестве растворителя трифторуксусную кислоту (ТФУК) перегоняли над сернокислым натрием при атмосферном давлении; температура кипения 72–73°. В работе использовали дважды дистиллированную воду.

Исследование конформационных переходов методом дисперсии оптического вращения (ДОВ) проводили на спектрополяризиметре «Jasco ORD/UV5» в области длин волн от 500 до 270 мк при концентрации раствора 1 мг/мл. Исследования проводили в 0,1 дм<sup>2</sup> кюветах. Результаты эксперимента анализировали с помощью уравнения Моффита [1]. Конформацию полипептида в твердом состоянии оценивали методом ИК-спектроскопии на спектрофотометре «UR-25». Электронно-микроскопические исследования проводили на микроскопе типа «JEM-7». Образцы препарировали методом теплового прикрепления [2].

Ранее на примере полиг-бензил-*L*-глутамата, полиг-карбобензоокси-*L*-лизина, полиг-лизина было обнаружено, что введение воды в растворы этих полипептидов в дихлоруксусной кислоте приводит к конформационному переходу типа клубок — спираль [3, 4]. Исследование поведения ПЛ в смесях ТФУК и воды показало, что введение уже небольших количеств воды (3 об. %) приводит к осаждению полипептида. Изучение конформации ПЛ в осадке мы проводили методом ИК-спектроскопии. На рис. 1 представлен спектр ПЛ, осажденного из раствора в ТФУК водой. Положение полос поглощения амид 1 ( $1650 \text{ см}^{-1}$ ) и амид 2 ( $1550 \text{ см}^{-1}$ ) [5] свидетельствует о наличии *α*-спиральной конформации в осадке ПЛ. Следует отметить, что данные ИК-спектроскопии использовались нами только для качественной оценки конформации полипептида.

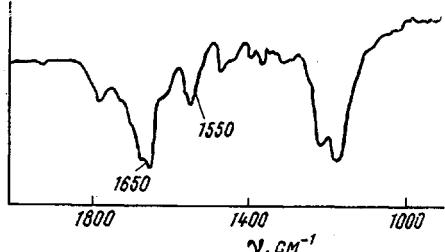


Рис. 1. ИК-спектр ПЛ, осажденного из раствора в ТФУК водой

При исследовании ДОВ раствора ПЛ в смесях ТФУК и воды удается наблюдать возникновение спиральной конформации вблизи точки осаждения ПЛ из раствора.

Данные ДОВ растворов ПЛ в смесях ТФУК и воды при 20° представлены ниже \*.

Вода, %	0	0,52	1,02	1,8	2,3	2,7 **	3 **	3 ***
$-b_0$	90	104	110	108	180	280	350	200
$-a_0$	635	620	610	610	580	350	275	475

По мере приближения к точке расслаивания растворы ПЛ начинают опалесцировать. Однако данные ДОВ таких растворов подчиняются уравнению Моффита и не зависят от длины используемой кюветы. Данные рис. 2

позволяют считать, что изменение параметра  $-b_0$  соответствует изменению степени спиральности макромолекулы в растворе.

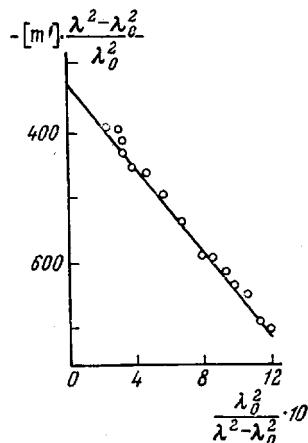


Рис. 2

Рис. 2. Данные ДОВ в координатах Моффита для апалесцирующего раствора ПЛ в смеси ТФУК и воды (3 об. %).

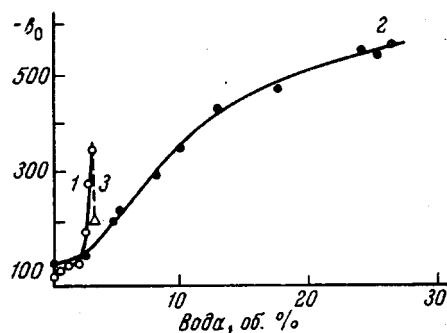


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость параметра  $-b_0$  от концентрации воды в смесях ТФУК и воды: 1 — ПЛ, 2 — ПА, 3 — раствор ПЛ в ТФУК и воде, охлажденный до 7°

Для выяснения причины повышения степени спиральности ПЛ вблизи точки осаждения нами было исследовано поведение в смесях ТФУК и воды сходного по строению полипептида — ПА. Конформационный переход ПА в этих смесях не осложняется явлениями структурообразования. Как видно из рис. 3, центр конформационного перехода ПА соответствует введению в раствор ПА в ТФУК 10 об. % воды, в то время как в случае ПЛ введение 3 об. % воды приводит к конформационным изменениям.

Для выяснения причины столь разного поведения этих полипептидов мы оценивали относительную устойчивость  $\alpha$ -спиральной конформации по отношению к действию сильных кислот в условиях, когда и тот и другой полипептиды претерпевают конформационные изменения на молекулярном уровне. Исследования проводились в смесях ТФУК и хлороформа, где спирализующим агентом является хлороформ. Непосредственно перед началом измерений хлороформ перегоняли. Как видно из рис. 4, конформационный переход ПА соответствует меньшим концентрациям хлороформа (центр перехода соответствует 20 об. % хлороформа), чем в случае ПЛ (центр перехода — 40 об. % хлороформа). Таким образом, можно думать, что  $\alpha$ -спиральная конформация ПА более устойчива к действию ТФУК, чем у ПЛ. Этот вывод хорошо согласуется с данными, известными из литературы [6]. Ранее было показано, что при замене одного спирализирующего агента

\* Данные рассчитаны методом наименьших квадратов.

\*\* Опалесцирующие растворы.

\*\*\* Охлажденный до 7° прозрачный раствор.

другим относительная устойчивость  $\alpha$ -спиралей не изменяется [3, 4]. Тем не менее мы наблюдаем инверсию устойчивости  $\alpha$ -спиральной конформации ПЛ и ПА при замене воды на хлороформ (рис. 3, 4). По-видимому, этот факт можно объяснить, предположив связь между структурообразованием в растворе и конформационным переходом ПЛ. Нами было обнаружено, что растворимость ПЛ в смесях ТФУК и воды повышается с понижением температуры и что растворение агрегатов макромолекул сопровождается понижением степени спиральности (рис. 3). Данные зависимости параметра  $-b_0$  от температуры приведены выше. Этот факт может свиде-

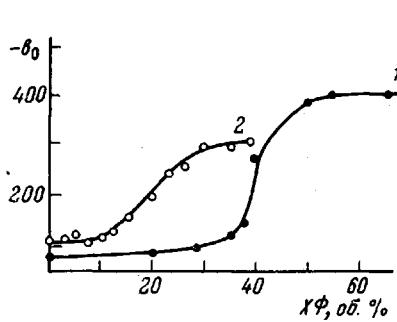


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость параметра  $-b_0$  от концентрации хлороформа в смесях ТФУК и хлороформа: 1 — ПЛ, 2 — ПА

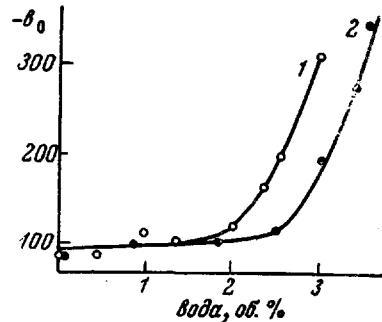


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость параметра  $-b_0$  от концентрации воды для растворов ПЛ в смесях ТФУК и воды: 1 — без хлороформа; 2 — введено 10 об. % хлороформа

тельствовать о связи конформационных изменений ПЛ со структурообразованием раствора. Растворимость ПЛ в этих смесях может быть повышена введением неполярного компонента, например хлороформа. Введение 10 об. % хлороформа в агрегированные растворы ПЛ в смеси ТФУК и воды (3 об. %) приводит к исчезновению опалесценции и сопровождается понижением степени спиральности. Кроме этого обнаружено, что если заранее ввести хлороформ в растворы ПЛ в ТФУК в концентрации, явно недостаточной для осуществления конформационного перехода, и вновь в качестве спирализующего агента использовать воду, точка расслаивания смешивается в область больших концентраций воды. Одновременно с этим наблюдается смещение области возрастания степени спиральности ПЛ, и конформационный переход вновь попадает в область структурирования раствора, что показано на рис. 5. Наряду с этим оказалось, что если вводить в растворы полипептидов различные спирализующие агенты и если конформационный переход происходит в гомогенных средах, то наблюдается совместное действие спирализующих агентов.

На рис. 6 представлен профиль конформационного перехода полипептида  $\gamma$ -бензил-L-глутамата в растворе в дихлоруксусной кислоте, в который последовательно вводили диметилформамид и затем, по достижении 50% степени спиральности — хлороформ. Это подтверждает выдвиннутое нами предположение об инициировании конформационного перехода ПЛ структурообразованием в растворе.

Интересно сопоставить морфологию надмолекулярных структур ПЛ, возникающих в агрегированных растворах в смесях ТФУК и воды с морфологией структур ПЛ, возникающих при испарении ТФУК из растворов ПЛ в ТФУК. Препарирование агрегированных растворов проводили методом теплового прикрепления [2]. На рис. 7 представлена микрофотография образцов ПЛ, полученных испарением растворителя из раствора ПЛ в ТФУК. Видно, что структура имеет ярко выраженный фибриллярный характер. По-видимому, фибриллы образуются путем боковой агрегации спиральных макромолекул. Совсем иной характер структурообразования наблюдается в агрегированных растворах. В этом случае, как видно из

рис. 7, 6, имеют место симметричные структуры глобулярного типа, состоящие из десятков макромолекул. Конформационный переход вблизи точки расслаивания можно представить себе следующим образом. Макромолекулярные клубки по мере ухудшения растворителя претерпевают сжатие. Из литературы известно, что размеры макромолекул вблизи точки осаждения могут уменьшаться в несколько раз [7, 8]. Такие эффекты рассматриваются как переходы клубок — глобула. При подобном переходе концентрация сегментов в объеме, занимаемом макромолекулой, возрастает, что может обусловить конформационные изменения полипептида. Предложенное объяснение обнаруженного нами эффекта, по-видимому, не является единственно возможным. Ухудшение растворителя вызывает вблизи точки расслаивания агрегацию полипептида. В этом случае конформационный переход может происходить вследствие уменьшения концентрации ТФУК в агрегате. Можно думать, что в нашем случае имеют место оба рассмотренных механизма одновременно. Однако для окончательного выяснения этого вопроса требуются дополнительные исследования.

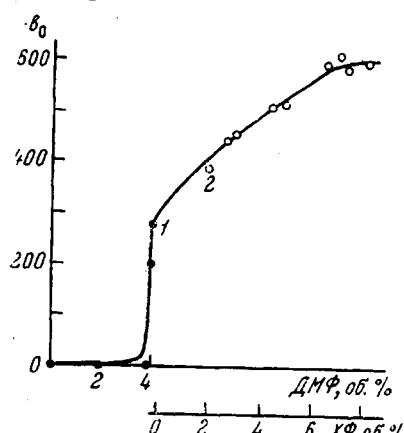


Рис. 6. Зависимость параметра  $-b_0$  от суммарной концентрации спираллизующих агентов для поли-*L*-бензил-*L*-глутамата в дихлоруксусной кислоте: 1 — ДМФ, об.%; 2 — ХФ, об.%

смкотренных механизма одновременно. Однако для окончательного выяснения этого вопроса требуются дополнительные исследования.

#### Выводы

Методом дисперсии оптического вращения исследовано поведение поли-*L*-лейцина и поли-*L*-аланина в смесях трифторуксусной кислоты и воды и трифторуксусной кислоты и хлороформа. Показано, что осаждение поли-*L*-лейцина из растворов в трифторуксусной кислоте сопровождается конформационным переходом типа спираль — кубок. Предложено возможное объяснение наблюдаемых эффектов.

Московский  
государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию  
9 X 1969

#### ЛИТЕРАТУРА

- К. Джераси, Дисперсия оптического вращения, Изд-во иностр. лит., 1962, стр. 322.
- С. Б. Степанов, Биофизика, 7, 725, 1965.
- А. Б. Зезин, Н. Ф. Бакеев, О. А. Алексина, П. В. Козлов, Докл. АН СССР, 172, 889, 1967.
- А. Б. Зезин, Н. Ф. Бакеев, В. М. Гуревич, П. В. Козлов, Abstrakts of International Symposium on Macromolecular chemie, Toronto, 1968.
- С. Н. Bamford, A. Elliot, W. E. Hanby, Synthetic polypeptides, N. Y., 1956.
- G. D. Fasman, in «Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins», M. Stahmann, Ed. University of Wisconsin Press, Madison, Wis., 1962, p. 221.
- Ю. Е. Эйзнер, Высокомолек. соед., A11, 364, 1969.
- В. Е. Эскин, И. Н. Сердюк, Высокомолек. соед., A11, 362, 1969.

#### CONFORMATIONAL TRANSITIONS IN POLYPEPTIDES IN SOLUTIONS NEAR THE PRECIPITATION POINT

A. B. Zezin, V. A. Kasatkin, N. Ph. Bakiev

#### Summary

The dispersion of optical rotation of high molecular weight poly-*L*-leucin and poly-*L*-alanin in mixtures of trifluoroacetic (TFFA) acid with water or with chloroform has been studied. Conformational transition of poly-*L*-leucin in mixture of TFFA and water is due to aggregation of polypeptide. As shown by IR-spectroscopy the precipitated polymer has  $\alpha$ -helix conformation. Structure of aggregated polyleucin has been studied by electron microscopy. The mechanism of conformational transition of polypeptides near the precipitation point has been proposed.

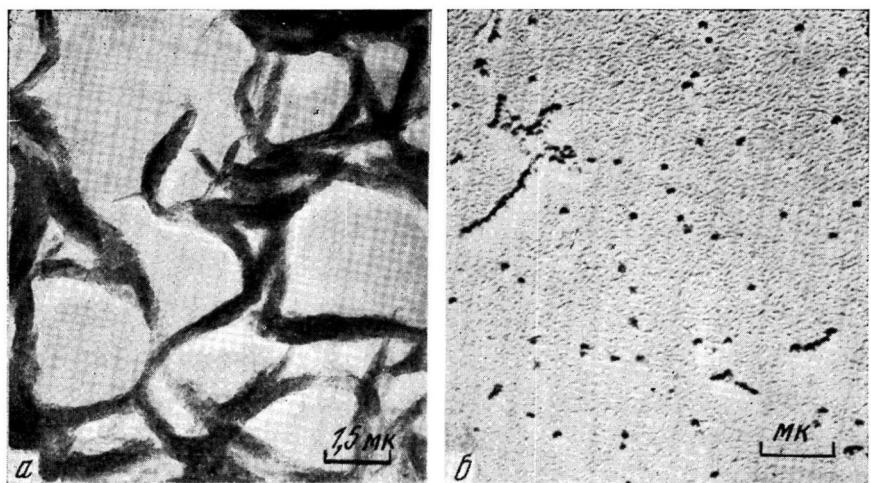


Рис. 7. Электронно-микроскопический снимок ПЛ, осажденного из раствора в ТФУК водой (а) и агрегированного раствора ПЛ в смеси ТФУК и воды (б)