

К ОЦЕНКЕ КОНФОРМАЦИЙ КАЗЕИНА И ЕГО ФРАКЦИЙ

M. N. Панкратова, В. Н. Измайлова

В течение последнего десятилетия дисперсия оптического вращения (ДОВ) широко используется для установления вторичной структуры белков и полипептидов [1—3]. Этот метод дает возможность количественно оценить содержание различных конформаций в структуре белка. Экспериментальные данные по ДОВ обычно обрабатываются по уравнению для сложной дисперсии, теоретически полученному Моффитом [3]

$$[m']_l = \frac{a_0 \lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + \frac{b_0 \lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2} = \frac{3}{n^2 + 2} \frac{M_0}{100} [\alpha],$$

где $[m']_l$ — эффективное вращение на аминокислотный остаток, которое равно $\frac{3}{n^2 + 2} \frac{M_0}{100} [\alpha]$, M_0 — средний эквивалентный вес аминокислотного

остатка; n — показатель преломления среды; λ_0 — длина волны поглощения белка в УФ-области; $[\alpha]$ — величина удельного оптического вращения; a_0 — постоянная, характеризующая взаимодействие между молекулами растворителя и белка, также учитывает содержание α -спиральных форм в структуре; b_0 — постоянная, характеризующая конформацию полипептидной цепи и количество α -спиральных участков в ней.

В последнее время появились работы, посвященные разработке новых подходов к анализу данных по ДОВ [4—7].

Излагаемое ниже исследование посвящено применению метода обработки данных по ДОВ, предложенного Имахори и Иони [7] к оценке конформаций казеина и его α - и β -фракций.

Этот метод позволяет оценить вклад каждой из трех известных в настоящее время (α -спираль, β -структура и «статистический» клубок) конформаций во вторичную структуру белка. Сущность метода состоит в том, что параметры a_0 и b_0 , рассчитанные из данных по ДОВ на основании уравнения Моффита для сложной дисперсии, записываются в виде следующих линейных комбинаций:

$$a_0 = x^R a_0^R + x^H a_0^H + x^\beta a_0^\beta \quad (1)$$

$$b_0 = x^R b_0^R + x^H b_0^H + x^\beta b_0^\beta, \quad (2)$$

где x^R , x^H , x^β — доля различных конформаций (статистического клубка, α -спирали, β -структуры) в структуре данного белка; a_0^R , a_0^H , a_0^β — значения параметра a_0 для структур, целиком (на 100%) состоящих из статистического клубка, α -спирали и β -структуры соответственно; b_0^R , b_0^H , b_0^β — обычно принимаемые значения параметра b_0 для структур, целиком состоящих из статистического клубка, α -спирали и β -структуры.

Так как по условию

$$x^R + x^H + x^\beta = 1, \quad (3)$$

то, решая систему уравнений (1) — (3), можно найти численные значения x^R , x^H , x^β для исследуемого белка.

Предварительно нами была проверена применимость изложенного выше метода к анализу такого хорошо изученного белка, как лизоцим.

Так как $b_0^R = 0$ (из эксперимента для раствора лизоцима в 8 M мочевине), то система уравнений (1) — (3) после ряда преобразований сводилась к следующим выражениям:

$$x^\beta (a_0^\beta + 1,1 b_0^\beta) = a_0 - a_0^R + 1,1 b_0 \quad (4)$$

$$b_0 = x^H b_0^H + x^\beta b_0^\beta \quad (5)$$

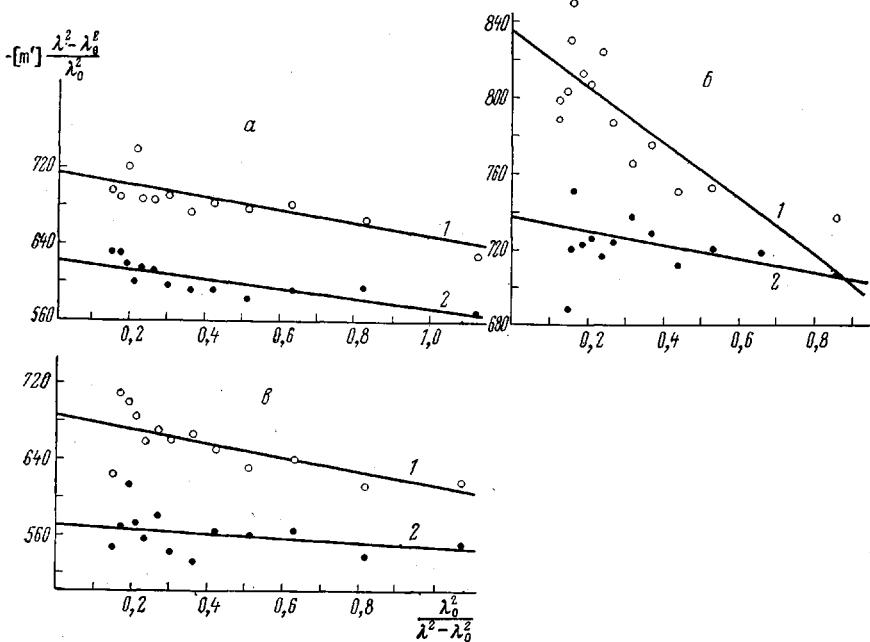
$$1 = x^H + x^\beta + x^R \quad (6)$$

Из данных, рассчитанных на основании эксперимента, использовали значения параметров $a_0 = -356$ и $b_0 = -155$, что было найдено для водных растворов лизоцима, $a_0^R = -312$ и $b_0^R = 0$ для растворов в 8 M мочевине.

Полагая в уравнениях (4) и (5) $b_0^H = -630$ (что принято для эталона 100% α -спиралей [7]) и $a_0^\beta = -1950$ и $b_0^\beta = 125$ (что характеризует поли-L-пролин — эталон 100% β -структур [8]), рассчитали для лизоцима следующие значения: $x^H \sim 27$, $x^\beta \sim 12$, $x^K \sim 61\%$.

Из данных рентгеноструктурного анализа лизоцима [9] известны такие значения содержания различных конформаций: спирали α — 35% (причем отмечается, что α -спираль не составляет все 35%), β -структуры — 10 и статистического клубка — 55%.

Как видно из сравнения данных, полученных нами, с имеющимися в литературе, используемый метод расчета [7] дает удовлетворительное сходство результатов. Это послужило основанием применения этого метода для расчета содержания раз-



Графический расчет параметров a_0 и b_0 из уравнения Моффита для растворов целого казеина (a), α -казеина (б) и β -казеина (в) при 20 (1) и 50° (2); pH = 10,5

а: $a_0 = -715$ (1), -623 (2), $b_0 = 62$ (1), 45 (2), $c = 0,56$ г/100 мл раствора; б: $a_0 = -839$ (1), -740 (2), $b_0 = 150$ (1), 40 (2), $c = 0,57$ г/100 мл раствора; в: $a_0 = -686$ (1), -571 (2), $b_0 = 76$ (1), 25 (2), $c = 0,39$ г/100 мл раствора

личных конформаций во вторичной структуре сложного белка казеина и его α - и β -фракций.

Исследования конформаций макромолекул казеина в водном растворе методами ДОВ привели многих авторов [8, 10, 11] к выводу, что этот белок близок по конформации его макромолекул к статистическому клубку.

Измерения дисперсии оптического вращения казеина и его α - и β -фракций были проведены на автоматическом спектрополяриметре марки Jasco. ДОВ измеряли в интервале длин волн от 300 до 600 мкм . В работе использовали препарат казеина, полученный по методу Хаммарстена [12]. Фракционирование казеина осуществляли по методу Хиппа [13] с применением мочевины. Растворы казеина готовили на бидистиллате, растворяя казеин в растворе NaOH. pH всех исследованных растворов равно 10,5. Концентрации растворов казеина лежали в пределах от 0,4 до 0,6 г на 100 мл раствора. Экспериментальные данные обрабатывали по уравнению Моффита.

Результаты расчета экспериментальных данных по уравнению Моффита представлены в графическом виде на рисунке.

Для всех растворов казеина измерения ДОВ были проведены при 20 и 50°.

Полученные значения a_0 и b_0 для казеина и его α - и β -фракций использовали для расчета значений x^R , x^H , x^β .

Значения величин a_0^R , a_0^H , a_0^β , b_0^R , b_0^H , b_0^β , необходимые для решения системы уравнений (1) — (3), были взяты из литературных данных и приводятся в табл. 1 с указанием литературного источника.

Значения a_0^R равны -604 , -620 и -530° для казеина и его α - и β -фракций соответственно (см. табл. 1). Крещек [10] получил для растворов казеинов в 6,6 M мочевине — растворителе, способствующем образованию конформации статистического клубка, значения b_0^R , равные 0,0—60, что характерно для конформации статистического клубка.

Значения $a_0^H = -680$ и $b_0^H = -630$ и $a_0^\beta = -1950$ и $b_0^\beta = 125$, как и в случае лизоцима, были взяты в качестве эталонов для 100% α -спи-

Таблица 1

Значения параметров a_0 и b_0 для различных конформационных состояний казеина

Параметры	Казеин	α -Казеин	β -Казеин	Ссылка на литературу
a_0^R	-604	-620	-530	[10]
b_0^R	0	0	-60	
a_0^H	-680	-680	-680	[9]
b_0^H	-630	-630	-630	
a_0^β	-1950	-1950	-1950	[9]
b_0^β	125	125	125	

Таблица 2

Процентное содержание различных конформаций в структуре казеина и его фракций

Белок	Температура, °C	x^R , %	x^H , %	x^β , %
Целый казеин	20	98	2,0	0
	50	91	7,0	2,0
α -Казеин	20	96	1,5	2,5
	50	95	1,0	4,0
β -Казеин	20	84,8	11,2	4,0
	50	95,1	4,0	0,9

ральной конформации (a_0^H и b_0^H) и для 100% β -структурь (a_0^β и b_0^β).

После подстановки значений параметров a_0^R , b_0^R , a_0^H , b_0^H , a_0^β , b_0^β из табл. 1 задача сводится к решению следующей системы уравнений:

$$\begin{aligned} a_0 &= x^R a_0^R + x^H (-680) + x^\beta (-1950) \\ b_0 &= x^R b_0^R + x^H (-630) + x^\beta (125) \\ 1 &= x^R + x^H + x^\beta, \end{aligned}$$

которая в случае $b_0^R = 0$ (табл. 1) превращается в систему уравнений (4) — (6).

Подставляя экспериментально полученные значения a_0 и b_0 в уравнения данной системы (или в уравнения (4) — (6)) и решая эти системы, получили значения x^R , x^H , x^β , приведенные в табл. 2.

Выводы

Расчет содержания различных конформаций (из трех известных в настоящее время) в водных растворах целого, α - и β -казеинов на основании данных по дисперсии оптического вращения показал, что казеин и его фракции при 20 и 50° в основном находятся в конформации статистического клубка и лишь небольшая доля в конформации α -спиралей и β -структурь.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию
27 VII 1970

ЛИТЕРАТУРА

1. К. Джерасси, Дисперсия оптического вращения, Изд-во иностр. лит., 1962.
2. Аналитические методы белковой химии, под ред. В. Н. Ореховича, Изд-во иностр. лит., 1963, стр. 297.
3. P. Urness, P. Doty, Advances Protein Chem., 16, 401, 1961.
4. P. K. Sarkar, P. Doty, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 55, 981, 1966.
5. N. Greenfield, B. Davidson, G. Fasman, Biochem., 6, 1630, 1967.
6. M. E. Magar, Biochem., 7, 617, 1968.

7. Kazumoto Imahori, Hiroshi Jnonye, Biopolymers, 5, 639, 1967.
 8. T. F. Herskovitst, Biochem., 5, 1018, 1966.
 9. D. C. Phillips, Scient. Amer., 215, 78, 1966.
 10. G. C. Kresheck, Acta Chem. Scand., 19, 375, 1965.
 11. B. Jirgensons, Arch. Biochem. Biophys., 74, 57, 1958.
 12. O. Hammarsten, Textbook of Physiological chemistry, N. Y., 1900.
 13. N. Y. Hipp, M. L. Groves, J. H. Custer, T. L. McMeekin, J. Dairy Sci., 35, 272, 1952.
-

УДК 541.64 : 542.954

ПОЛИМЕРЫ НА ОСНОВЕ ТЕТРААМИНОБЕНЗОХИНОНА

Э. Н. Телешов, А. Н. Праведников

Известно, что поликонденсация 1, 2, 4, 5-тетрааминобензола с пиромеллитовым диангидридом (ПДА) приводит к образованию термостойкого лестничного полимера бензимидазопирролоновой структуры [1]. С целью синтеза лестничных полимеров, содержащих в цепи функциональные хиноидные группы, нами исследована поликонденсация тетраамино-бензохинона (ТАХ) и тетрааминогидрохинона (ТАГ) с ПДА или 2,5-ди-карбометокситетрафталоилхлоридом (ДМТФХ). Можно было ожидать, что как и в случае 1, 2, 4, 5-тетрааминобензола, эта реакция приведет к лестничному полимеру бензимидазопирролоновой структуры III

