

УДК 541.64 : 539.107 : 543.422.4

ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ
ПОЛИ-*L*-АЛАНИНА И ПОЛИ-*L*-ЛЕЙЦИНА
В СМЕШАННЫХ РАСТВОРИТЕЛЯХ МЕТОДОМ
ИК-СПЕКТРОСКОПИИ

Б. З. Волчек, А. В. Пуркина

В настоящее время наиболее надежными методами исследования конформаций и конформационных превращений в полипептидах можно считать метод дисперсии оптического вращения (ДОВ) [1], а в ряде случаев и метод ЯМР [2–5]. Известно достаточно много примеров совпадения оценок степени спиральности полипептидов проведенных этими двумя методами [3].

Однако при исследовании полиаланина (ПА) и полилейцина (ПЛ) методами ДОВ [5–7] и ЯМР [5, 8] были обнаружены значительные отличия в поведении этих полимеров в смешанных растворителях (трифтор-(ТФУК) или дихлоруксусная (ДХУК) кислоты – хлороформ) по сравнению с другими спиральными полипептидами, такими, например, как полиглутаматы. Поэтому до настоящего времени нет единого мнения о степени спиральности ПА и ПЛ [5, 7–11]. Интересен вопрос не только о возможности оценки спирального содержания ПА и ПЛ по данным ДОВ, но также и о причинах необычного поведения этих полимеров в растворе: низкого содержания спиральных участков и в то же время необычно большой стабильности этих спиралей [8, 12].

В данной работе мы предприняли попытку исследования ПА и ПЛ методом ИК-спектров поглощения.

Материалы и методика эксперимента

ИК-спектры снимали на двулучевом ИК-спектрометре UR-10 в области 1500–1800 и 3000–3400 см^{-1} и в интервале температур $-2\text{--}50^\circ$. Были исследованы образцы ПА фирм «Serva» и «Colnbrook Bucks» (Англия), $M_{\text{ПА}} = (30\text{--}40) \cdot 10^3$, а $M_{\text{ПЛ}} = 50 \cdot 10^3$. Для растворов применяли кюветы из CaF_2 , толщину слоя задавали прокладками из фольги ($>20 \text{ мкм}$) или тефлона (до 20 мкм). Концентрация исследованных растворов была $\sim 2\%$. ТФУК и ДХУК сушили над P_2O_5 и перегоняли при атмосферном давлении непосредственно перед экспериментом. Для получения поляризованных ИК-спектров ориентированных пленок ПА и ПЛ были использованы поляризаторы, состоящие из стопы селеновых пленок [13].

Результаты и их обсуждение

Как видно из рис. 1, при содержании в растворе ТФУК от 40 до 70% и ДХУК от 33 до 100% в ИК-спектрах в области 1600–1700 см^{-1} наблюдаются две полосы поглощения: 1661 и 1620 см^{-1} , а при концентрации ТФУК более 80% широкая полоса 1640 и 1661 см^{-1} . В области 3300–3400 см^{-1} при малых концентрациях кислоты наблюдаются полосы 3300 и 3360–3370 см^{-1} (при больших концентрациях кислоты полосы поглощения полимера в указанной области маскируются фоном от собственного поглощения кислоты). Полосы 1661 и 3300 см^{-1} наблюдаются

и в спектрах пленок ПА и по положению и дихроизму могут быть отнесены к амиду I и амиду A соответственно. Полоса 1620 см^{-1} отнесена нами к поглощению групп C=O основной цепи, связанных водородной связью с OH-группами кислоты, а полоса 3360 см^{-1} — к поглощению групп NH, связанных с группами C=O протонов соответствующей кислоты [14]. Таким образом, из спектров растворов ПА в смеси кислота — хлороформ следует, что в интервале концентраций кислоты в растворе 40–70% (ТФУК) и 33–100% (ДХУК) происходит взаимодействие кислоты с полипептидом с образованием водородных связей как с C=O-, так и с NH-группами основной цепи.

Сравнение отношений оптических плотностей полос амид I и 1620 см^{-1} и амид A и 3360 см^{-1} в интервале концентраций ТФУК 40–70% и ДХУК 33–100% (для амида A и 3360 см^{-1} эти измерения возможны в более узком интервале концентраций кислоты) показывает, что взаимодействие полимер—кислота в этих условиях остается постоянным.

Ранее было показано [15], что коэффициенты поглощения полос 1620 см^{-1} и амид I практически одинаковы. Подобное заключение может быть сделано и для полос 3300 и 3360 см^{-1} . Действительно, отношение оптических плотностей полос амид I и амид A и 1620 и 3360 см^{-1} в пределах 10% остается постоянным при разных степенях набухания (таблица). Равенство коэффициентов поглощения полос 1620 см^{-1} и амид I и амид A и 3360 см^{-1} позволяет определить долю пептидных групп, не участвующих во взаимодействии с кислотой до конформационного перехода. Она равна примерно половине. Сравнение данных, полученных для растворов ПА методами ДОВ и ИК-спектроскопии при одинаковых концентрациях кислоты в растворе, показывает, что по параметру b_0 [1] определяется количество спиральных участков, не связанных водородной связью с кислотой.

В работе [14] было показано, что большинство полипептидов в разной степени структурно неоднородно и имеются области регулярной и «дефектной» спирали. В частности, для ПА было показано, что в дефектных спиральных участках ориентация по отношению к оси спирали

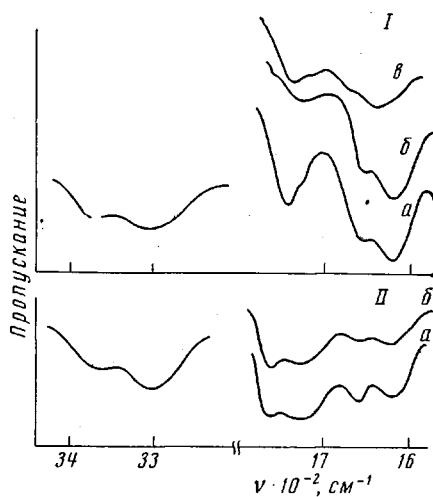


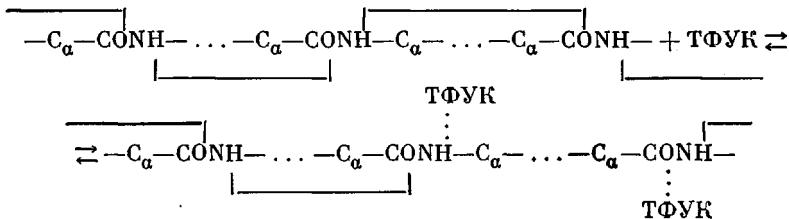
Рис. 1. ИК-спектры растворов ПА в смеси ТФУК — хлороформ (I) и ДХУК — хлороформ (II):
I: а — 40; б — 70 и е — 100% ТФУК, II:
а — 33 и б — 100% ДХУК

Отношения оптических плотностей полос амид I и амид A и 1620 и 3360 см^{-1} в ИК-спектрах пленок ПА при разных степенях набухания

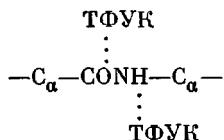
Кислота	Количество пептидных групп, взаимодействующих с кислотой, %	$D_{\text{амид I}}$	D_{1620}	$D_{\text{амид A}}$	D_{3360}	$\frac{D_{\text{амид I}}}{D_{\text{амид A}}}$	$\frac{D_{1620}}{D_{3360}}$
ТФУК	20	1,00	0,25	0,51	0,12	2,0	2,1
ДХУК	37	0,50	0,29	0,23	0,14	2,2	2,1
ТФУК	50	0,46	0,46	0,33	0,28	1,4	1,6
ДХУК	55	1,00	1,20	0,63	0,67	1,6	1,8

пептидных связей $C=O$ ~ на 10° отлична от ориентации этих связей в регулярных участках, что, очевидно, обусловлено различием углов внутреннего вращения Φ и ψ этих участков.

ИК-спектры поглощения растворов ПА при разных содержаниях кислоты могут быть интерпретированы следующим образом. Уже при минимальном содержании ТФУК в растворе (35–40%) все дефектные спиральные участки образуют водородные связи с кислотой. При этом, как было показано в набухших ориентированных пленках ПА, никаких конформационных изменений не происходит, и пептидные группы в регулярных спиральных участках не взаимодействуют с кислотой вплоть до 80% ее в растворе. При таком содержании кислоты начинается конформационный переход: интенсивность полосы 1661 см^{-1} уменьшается, исчезает полоса 1620 см^{-1} и появляется полоса 1640 см^{-1} , которая относится к амиду I клубка, сольватированного кислотой [14]. Отличие в частотах полос, соответствующих поглощению групп $C=O$ пептидного звена, в которых осуществлено взаимодействие с помощью водородных связей с кислотой до и после конформационного перехода (соответственно 1620 и 1640 см^{-1}), очевидно, определяется тем, что полоса 1620 см^{-1} соответствует поглощению групп $C=O$ дефектных участков, где взаимодействие с кислотой происходит по схеме



в то время как полоса 1640 см^{-1} соответствует поглощению групп $C=O$ в системе



Отметим, что полоса 1640 см^{-1} наблюдалась нами и в спектре клубкообразного поли-(*dl*-аланина) при тех же концентрациях ТФУК в растворе.

Интересно, что в спектрах растворов ПА даже в 100%-ной ТФУК не исчезает полоса 1661 см^{-1} , что означает присутствие остаточного количества регулярных спиралей. Около 20% спиралей присутствует в этих условиях в растворе ПА и по данным ДОВ [5, 6], что, вероятно, свидетельствует о том, что значение b_0 соответствует действительному содержанию регулярных спиралей. В ИК-спектрах ПА в смеси ДХУК – хлороформ не происходит заметных изменений во всем интервале концентраций ДХУК (33–100%). Поэтому увеличение параметра b_0 при уменьшении содержания ДХУК [7], вероятно, обусловлено агрегацией ПА [8], а не увеличением его степени спиральности. Наличие регулярных и дефектных спиральных участков, вероятно, может объяснить и особенности поведения этого полимера, наблюдаемые в спектрах ЯМР [8]. Узость линий и относительно малое их смещение при конформационном переходе можно объяснить достаточной подвижностью соответствующих протонов как до, так и после перехода. Как уже отмечалось выше, в ИК-спектрах растворов ПА при концентрациях кислоты от 40 до 70% нет каких-либо заметных изменений. Тот факт, что по данным ЯМР [16] в этом интервале состава растворителя наблюдается некоторое смещение

сигнала α_{CH} -протона, очевидно, связан с различной чувствительностью указанных методов.

Таким образом, специфическое поведение ПА в растворе может быть объяснено присутствием двух структур: дефектной, в которой угол наклона связи C=O к оси молекулы примерно на 10° отличается от соответствующего угла в α -спирале [14], и регулярной спиральной, которая реализуется в кристаллической части полимера. Мы рассматривали углы моментов перехода с осью спирали валентных колебаний связей C=O и NH-пептидного звена, рассчитанные из данных по ориентации этих связей по отношению к оси спирали (ориентация связей определялась по атомным координатам ПА, приведенным в работах [17, 18]) и углов моментов перехода соответствующих колебаний по отношению к связи C=O [16]. Угол θ между направлением момента перехода NH-валентного колебания и осью спирали мы вычислили также из дихроизма полосы амид A в поляризованных спектрах набухших ориентированных пленок ПА (степень набухания выбиралась такой, чтобы полностью «выбрать» из амида I вклад от дефектных участков) по методу, предложенному Фразером [19].

Совпадение значений угла θ , рассчитанных по данным ИК-спектроскопии и рентгеноструктурного анализа [18], свидетельствует о том, что модель спирали ПА, предложенная в работе [18], более вероятна, чем модель [17]. По модели [18] структура ПА представляет искаженную α -спираль с большей длиной водородной связи — 2,9 Å (вместо 2,83 Å) и углом HN...O 12° (вместе $0-2^\circ$).

Было исследовано также влияние температуры (в интервале $-2-50^\circ$) на конформационные переходы ПА в растворе при изменении содержания ТФУК от 40 до 70%. Никаких изменений в конформации ПА, а также изменений во взаимодействии с ТФУК нами не наблюдалось: 50% всех пептидных групп связаны с кислотой. В связи с этим нельзя считать правильным высказанное в работе [8] мнение об отсутствии взаимодействия кислоты с ПА при температуре выше 30° при указанном составе растворителя.

Нами был оценен размер кооперативного участка ПА по методу, предложенному в работе [20] с учетом конечности цепей [21]. Сопоставляли теоретические кривые зависимости относительных размеров спиральных макромолекул в области конформационного перехода от степени спиральности образца и аналогичные экспериментальные кривые, построенные по данным вискозиметрических измерений и ДОВ [8]. Хорошее совпадение теоретических и экспериментальных кривых может быть получено только тогда, когда минимум на кривой вязкости [8] будет соответствовать не 40%-ной спиральности ПА, как это следует из данных ДОВ, а 60%-ной. Этот факт свидетельствует о том, что степень упорядоченности макромолекул ПА выше, чем степень спиральности, оцененная по ДОВ, и в какой-то мере подтверждает наше предположение о структурной неоднородности ПА. Поскольку предполагаемая дефектная структура достаточно мало отличается от регулярной спирали, можно думать, что и вискозиметрические измерения отражают изменение общей степени упорядоченности. Для определения размеров кооперативного участка по методу [20] необходимо знать l — длину, приходящуюся на один мономер в клубкообразном состоянии. Для ПА значение l неизвестно. Для полиглутаминовой кислоты и поли-(γ -бензил-L-глутамата) l было найдено равным 11,4 Å [22], такое же значение было получено для полилизина [20]. В работе [21] l принято равным 22,4 Å. Если предполагать l для ПА = 11,4 Å, то размер кооперативного участка v равен 10 мономерным единицам (энергия инициирования спирального участка $F \sim 2,5$ ккал/моль); при $l = 22,4$ Å, $v = 40$ и $F = 4,5$ ккал/моль.

На рис. 2 приведены ИК-спектры растворов ПЛ в смешанном растворителе ТФУК — хлороформ при различном содержании ТФУК в растворе

(30–100%). Как видно, и в этом полимере уже при минимальном содержании ТФУК в растворе наряду с полосами поглощения амид I и 1651 см^{-1} и амид A и 3300 см^{-1} наблюдаются довольно интенсивные полосы 1620 и 3360 см^{-1} . Это указывает на то, что и ПЛ имеет значительное количество дефектных участков. По аналогии с ПА была проведена оценка содержания регулярной спиральной структуры в ПЛ в смешанном растворителе. В растворе, содержащем 30% ТФУК, доля регулярной структуры равна 55%. При дальнейшем увеличении содержания кислоты, вплоть до 60%, соотношение регулярной и дефектной частей в ПЛ не изменяется. Как видно, количественная оценка спиральности и ее ход достаточно хорошо согласуются с данными по ДОВ, если считать, что метод ДОВ фиксирует только регулярную часть спиральной конформации. Совпадение методов ДОВ и ИК-спектров в оценке конформационных изменений наблюдается и при дальнейшем увеличении концентрации ТФУК в растворе. При 60% ТФУК в растворе происходит конформацион-

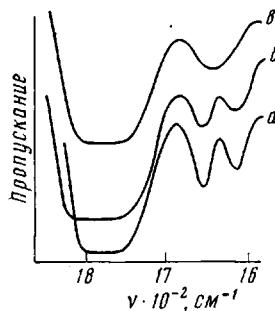


Рис. 2

Рис. 2. ИК-спектры растворов ПЛ в смеси ТФУК – хлороформ при содержании ТФУК 30 (a); 50 (б) и 100% (в)

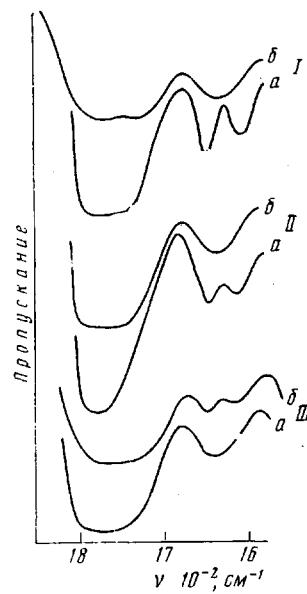


Рис. 3

Рис. 3. ИК-спектры растворов ПЛ в смеси ТФУК – хлороформ при содержании ТФУК 30 (I); 50 (II) и 70% (III)

I: a – 25, б – -24° ; II: a – 25, б – 18° ; III: a – 25, б – 40°

ный переход упорядоченная структура – клубок, что фиксируется параметром b_0 и появлением в спектре полосы 1640 см^{-1} .

Как указывалось выше, исследование растворов ПЛ методом ЯМР показало, что, в отличие от ПА, ПЛ ведет себя как обычный спиральный полимер, т. е. при малых содержаниях ТФУК в растворе происходит значительное расширение пиков NH - и α_{CH} -протонов и их соответствующее смещение [9] по сравнению с их шириной и положением в спектрах растворов в 100%-ной ТФУК. Ранее такое различие объяснялось строением боковых цепей ПЛ и ПА [9]. С нашей точки зрения эти различия обусловлены характером дефектов в структурах этих полимеров. Действительно, исследование набухших в ТФУК ориентированных пленок ПЛ показало, что дефектная структура мало отличается от регулярной структуры этого полимера: дихроичные отношения D полос амид I и 1620 см^{-1} и амид A и 3360 см^{-1} практически одинаковы. На малое различие дефектных и регулярных спиралей указывает также и частотное положение амида I [14].

Особенностью ПЛ по сравнению с ПА является возможность получения температурных конформационных переходов при определенном со-

ставе растворителя. Как следует из рис. 3, понижение температуры раствора приводит к так называемому «инвертированному» переходу, т. е. спиральная конформация ПЛ, подобно спирали поли-(γ -бензил-L-глутамата) [23, 24], стабильна при высокой температуре, а клубкообразное состояние — при низкой. Однако в отличие от других полипептидов переходы спираль — клубок при понижении температуры в ПЛ наблюдаются в более широком интервале состава растворителя (рис. 3). Это обстоятельство, вероятно, обусловлено более сильным, чем в других полипептидах, связыванием кислоты с молекулами этого полимера.

Выводы

1. Проведено исследование конформаций и конформационных переходов полиаланина (ПА) и полилейцина (ПЛ) в смешанных растворителях (трифтор- и дихлоруксусные кислоты — хлороформ) при разных температурах методом ИК-спектроскопии.

2. Показано, что особенностями конформаций этих полимеров в растворе являются наличия регулярной и «дефектной» спиральных структур.

3. На основании этих представлений проведено сопоставление данных, полученных для ПА при исследовании его конформации методами дисперсии оптического вращения, ЯМР и ИК-спектроскопии.

4. В ПЛ наблюдался «инвертированный» температурный переход спираль — клубок в широком интервале содержания кислоты в растворе.

5. Определены пределы размеров кооперативного участка в ПА.

Институт высокомолекулярных соединений
АН СССР

Поступила в редакцию
2 VIII 1974

ЛИТЕРАТУРА

1. W. Moffitt, J. T. Jang, Proc. Nat. Acad. Sci., **42**, 596, 1956.
2. M. Coodman, Y. Masuda, Biopolymers, **2**, 107, 1964.
3. E. M. Bradbury, H. Goldmann et al., Nature, **217**, 812, 1968.
4. J. L. Markley, D. H. Meadows, O. Tardezy, J. Molec. Biol., **27**, 25, 1967.
5. W. Stewart, L. Mandelkern, R. Glick, Biochemistry, **6**, 143, 1967.
6. G. D. Fasman, Polypeptides, Polyaminoacids, Proteins, Madicon, 1962, стр. 221.
7. E. M. Bradbury, H. W. E. Rattle, Polymer, **9**, 201, 1968.
8. A. Takachashi, L. Mandelkern, R. Glick, Biochemistry, **8**, 1673, 1969.
9. E. M. Bradbury, C. Crane-Robinson, H. W. E. Rattle, Nature, **216**, 862, 1967.
10. J. Ferretti, L. Paolillo, Biopolymers, **7**, 155, 1969.
11. A. Warashina, T. Jio, T. Isomura, Biopolymers, **9**, 1445, 1970.
12. E. M. Bradbury, C. Crane-Robinson, Nature, **220**, 1079, 1968.
13. В. Н. Никитин, М. В. Волькенштейн, Б. З. Волчек, Ж. теорет. физики, **25**, 2486, 1955.
14. Б. З. Волчек, А. В. Пуркина, Высокомолек. соед., **A14**, 551, 1972.
15. Б. З. Волчек, А. В. Пуркина, Высокомолек. соед., **A11**, 1563, 1969.
16. N. Abbott, A. Elliott, Proc. Roy. Soc., **A234**, 247, 1956.
17. A. Elliott, B. Malcolm, Proc. Roy. Soc., **A249**, 30, 1959.
18. S. B. Agnott, A. Wonacott, J. Molec. Biol., **21**, 371, 1966.
19. R. D. B. Fraser, J. Chem. Phys., **29**, 1428, 1958.
20. О. Б. Птицын, А. М. Скворцов, Биофизика, **10**, 909, 1965.
21. A. Teramoto, T. Norisuye, H. Fujita, Polymer J., **1**, 55, 1970.
22. D. Brant, P. Flory, J. Amer. Chem. Soc., **87**, 2791, 1965.
23. A. Teramoto, K. Nakagawa, H. Fujita, J. Chem. Phys., **46**, 4197, 1967.
24. F. E. Karasz, J. M. O'Reilly, Biopolymers, **5**, 27, 1967.

IR-SPECTROSCOPIC STUDY OF THE CONFORMATIONAL TRANSFORMATIONS OF POLY-L-ALANINE AND POLY-L-LEUCINE IN MIXED SOLVENTS B. Z. Volchek, A. V. Purkina

Summary

The IR-spectroscopic study of the conformations and conformational transformations in poly-L-alanine and poly-L-leucine has shown that the configurational specificity of these polymers is associated with the presence of a «regular» and of a somewhat distorted spiral structures. In the light of these concepts, a comparison is made between the data obtained for these polymers by the NMR optical rotation dispersion and by IR-spectroscopy. The temperature dependence of the configurational transitions in these polymers has been studied.