

УДК 541(64+14):539.3

**ФОТОРЕАКЦИИ ПЕРВИЧНЫХ МАКРОРАДИКАЛОВ  
ПРИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ДЕСТРУКЦИИ ФИБРОИНА ШЕЛКА**

*Лъзов К. М., Гасымов О. К., Мамедов Ш. В.*

Исследованы фотопреобразования первичных макрорадикалов —  $\text{NH}-\text{C}_\alpha\text{HR}$  и  $\text{CO}-\text{NH}-$ , возникающих при механической деструкции фибронина шелка при 77 К. В радикале  $\text{CO}-\text{NH}-$  под действием света с  $\lambda = 330-390$  нм происходит разрыв пептидной связи с образованием радикала, не чувствительного к свету. Макрорадикал  $\text{NH}-\text{C}_\alpha\text{HR}$  претерпевает под действием света характерные для него фотопревращения. Протекание этих фотопреобразований подтверждает сделанный ранее вывод о разрыве при механической деструкции фибронина шелка связи  $\text{C}_\alpha-\text{C}$  основной пептидной цепи при 77 К.

Ранее было установлено, что при механической деструкции белков разрывается пептидная цепь и происходит образование свободных радикалов [1-7]. Для разных белков на ранних стадиях деструкции всегда наблюдался характерный спектр ЭПР триплетной формы [4, 7]. Показано, что при механической деструкции фибронина шелка при 77 К разрыв остова пептидной цепи происходит по связи  $\text{C}_\alpha-\text{C}$  и образуются макрорадикалы двух типов:  $\text{NH}-\text{C}_\alpha\text{HR}$  и  $\text{CO}-\text{NH}-$  [8]. В настоящей работе изучены фотопреобразования этих макрорадикалов, протекающие при 77 К.

Фибронин шелка в жидким азоте измельчали ножницами на фрагменты длиной ~1 мм. Из-за высокой чувствительности свободных радикалов к свету измельчение фибронина шелка проводили при слабом освещении. Для получения спектра ЭПР брали 10–20 мг измельченного белка. Спектры измеряли при 77 К на спектрометре РЭ 1306. При изучении фотопреобразований радикалов использовали ртутную лампу сверхвысокого давления мощностью 1000 Вт (ДРШ-1000) с водным фильтром толщиной 8 см. Необходимые спектральные области выделялись стеклянными фильтрами: область с  $\lambda=330-390$  нм — фильтрами СЗС 23, УФС 6, область с  $\lambda>520$  нм — фильтром ОС 11.

Спектр ЭПР фибронина шелка, измельченного при 77 К, приведен на рис. 1, а. Он представляет собой триплет с соотношением амплитуд 1,3 : 1,6 : 1. Расщепление между первой и второй компонентами  $23,7 \pm 0,2$  Гц и между второй и третьей —  $22,6 \pm 0,2$  Гц, ширина компонент равна соответственно  $8,6 \pm 0,2$ ;  $8,1 \pm 0,1$  и  $9,9 \pm 0,2$  Гц. Облучение светом с  $\lambda=330-390$  нм при 77 К приводит к фотопреобразованию, при которой исходные радикалы превращаются в радикалы, имеющие синглетный спектр ЭПР с  $\Delta H=17,1 \pm 0,2$  Гц (рис. 1, б). При последующем действии на образец света с  $\lambda>520$  нм интенсивность синглета уменьшается и наблюдается появление структурированного сигнала ЭПР (рис. 1, в). В спектре ЭПР, который получается при облучении светом с  $\lambda>520$  нм, центральная компонента больше соответствующей компоненты в исходном спектре как по амплитуде, так и по ширине. Ширина этой компоненты равна  $16,1 \pm 0,3$  Гц. Повторное действие света с  $\lambda=330-390$  нм на образец приводит к фотопреобразованию, в которой исчезают радикалы, ответственные за структурированный спектр ЭПР, и появляются радикалы, дающие синглетный спектр (рис. 1, г). Этот спектр очень близок по форме к спектру ЭПР, приведенному на рис. 1, б. Картина изменения спектра ЭПР при дальнейшем последовательном облучении образца светом с  $\lambda>520$  нм и 330–390 нм многократно повторяется (рис. 1). Интегральная интенсивность спектра при этом не меняется.

В предыдущей работе [8] на основании подробного анализа перехода исходного спектра ЭПР (рис. 1, а) в синглетный (рис. 1, б) и рассмотрения типов радикалов, которые должны были бы возникать при разрыве

других связей остава пептидной цепи, был сделан вывод о том, что при механической деструкции фиброна шелка при 77 К наблюдается разрыв только связи  $C_\alpha$ —С и образуются радикалы типа  $-NH-C_\alpha HR$  (I) и  $CO-NH-$  (II). Рассмотрим фотопревращения этих радикалов. Макрорадикалы типа I хорошо изучены. Они возникают, например, в УФ-облученных при 77 К белках в ходе вторичной фотопреакции [9, 10]. Вид спектра ЭПР этих радикалов зависит от типа группы R, связанной с  $C_\alpha$ -атомом.

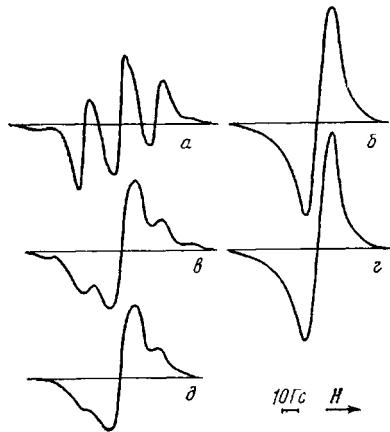


Рис. 1

Рис. 1. Спектры ЭПР радикалов измельченного фиброна шелка при 77 К: а — до облучения, б — после облучения светом с  $\lambda=330-390$  нм в течение 30 мин, в — последующее облучение светом с  $\lambda>520$  нм (10 мин), г — с  $\lambda=330-390$  нм (30 мин), д — с  $\lambda>520$  нм (10 мин)

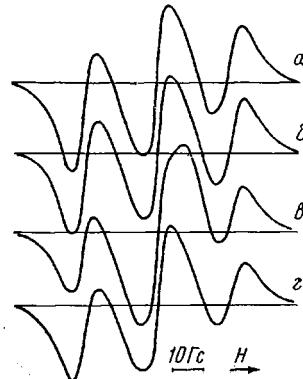


Рис. 2

Рис. 2. Спектр ЭПР радикалов измельченного фиброна шелка при 77 К: а — до облучения, б — после облучения светом с  $\lambda>520$  нм (10 мин); в — последующее облучение светом с  $\lambda=330-390$  нм (2 мин), г — с  $\lambda>520$  нм (10 мин)

Фиброн шелка содержит 44,5% остатков глицина, 29,3% аланина, 12,1% серина и 14,1% остатков других аминокислот. В случае, если разрыв разных  $C_\alpha$ —С-связей равновероятен, вид спектра ЭПР радикалов типа I будет определяться в основном разрывами связи  $C_\alpha$ —С в остатках глицина и аланина. В случае разрыва связи  $C_\alpha$ —С в остатке глицина спектр ЭПР радикала I будет представлять собой триплет с соотношением интенсивностей компонент  $1:2:1$ , в случае остатков аланина получим квинтет  $1:4:6:4:1$ . Эти спектры имеют близкие величины расщеплений и ширины компонент, значения g-факторов радикалов также близки. Поэтому компоненты первого спектра хорошо совмещаются с тремя средними компонентами второго. Соотношение амплитуд компонент суммарного спектра радикалов типа I с учетом относительного содержания аминокислотных остатков в этом случае будет равно  $1:10:18:10:1$ . Крайние компоненты этого спектра слабые. В сложном спектре ЭПР для наблюдения за поведением радикала типа I удобны вторая и четвертая компоненты. Расщепление между ними определяется спектром радикала глицинового типа, дающего максимальный вклад в спектр, и близко к 42 Гц. В исходном спектре (рис. 1, а) интегральный вклад сигнала ЭПР радикалов типа I равен 50%.

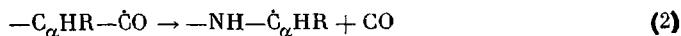
При действии на радикалы I света в диапазоне 330—390 нм происходит разрыв пептидной связи [9, 10]



Макрорадикал типа  $-C_\alpha HR - CO$  (III) имеет синглетный спектр ЭПР с  $\Delta H=13\pm2$  Гц и  $g=2,001$  [9—12]. Ранее нами было показано, что кинетика перехода исходного спектра ЭПР в синглетный под действием света 330—390 нм определяется двумя фотопреакциями. В ходе реакции, имеющей большую константу скорости, возникает синглетный спектр ЭПР с  $\Delta H\simeq14$  Гц [8]. Это свидетельствует о том, что в фиброне шелка, подверг-

путем механической деструкции, при действии света с  $\lambda=330-390$  нм действительно протекает реакция (1).

Радикалы III при облучении светом с  $\lambda>520$  нм могут участвовать в реакции (2) [9-12]



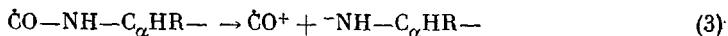
В этой реакции они снова превращаются в радикалы типа I.

Действительно, при действии света с  $\lambda>520$  нм на фибронин шелка после деструкции и облучения светом 330-390 нм наблюдается уменьшение амплитуды синглетного сигнала и появление многокомпонентного спектра ЭПР (рис. 1,  $\epsilon$ ). Расщепление между крайними компонентами этого спектра составляет  $\sim 84$  Гс, а между второй и предпоследней компонентами —  $\sim 43$  Гс. Эти величины равны соответственно расщеплению между крайними компонентами квинтетного спектра ЭПР в случае, если в радикале I  $\text{R}=\text{CH}_3$  (остаток аланина), или расщеплению между крайними компонентами триплетного спектра ЭПР, если  $\text{R}=\text{H}$  (остаток глицина). Соотношение амплитуд первой и второй компонент примерно соответствует предсказанному для суммарного спектра радикала типа I. Таким образом, в фибронине шелка после механической деструкции и облучения светом в диапазоне 330-390 нм при действии света с  $\lambda>520$  нм действительно протекает фотопривращение (2). Образовавшиеся при этом радикалы I могут опять участвовать в цикле фотопривращений (1) и (2). Характер изменений спектра повторяется (рис. 1,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ). Все сказанное выше относительно фотопривращений радикала I иллюстрирует рис. 2. Видно, что исходный спектр измельченного фибронина шелка (рис. 2,  $a$ ) не изменяется при действии света с  $\lambda>520$  нм (рис. 2,  $b$ ). Это означает, что в образце отсутствуют радикалы типа III. На рис. 2,  $c$  приведен спектр ЭПР измельченного фибронина шелка, в котором уже закончилась быстрая реакция, а степень превращения исходных радикалов, участвующих в медленной реакции, мала. Видно, что центральная компонента выросла по амплитуде и по ширине. Ее ширина стала  $\sim 14$  Гс, что соответствует ширине спектра радикала III. При последующем облучении светом с  $\lambda>520$  нм уменьшается как амплитуда, так и ширина центральной компоненты, а первая и третья компоненты триплета вырастают (рис. 2,  $\epsilon$ ). Эта картина соответствует изменениям спектра ЭПР в реакции (2). Таким образом, рис. 2 демонстрирует, что в измельченном фибронине шелка действительно возникают радикалы типа I, характерные реакции которых и наблюдаются при последовательном действии света с  $\lambda=330-390$  и  $>520$  нм. При этом именно реакция (1) ответственна за быструю часть кинетики перехода исходных радикалов в радикалы, имеющие синглетный спектр ЭПР. После каждого цикла реакций (1) и (2) количество радикалов типа I уменьшается (рис. 1,  $a$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ; 2,  $a$ ,  $\epsilon$ ). Это свидетельствует о том, что при действии света с  $\lambda=330-390$  и  $>520$  нм протекают не только реакции (1) и (2), но и другие процессы, в результате которых исходные радикалы выводятся из цикла и образуются радикалы, не чувствительные к действию света. В каждом цикле в такие радикалы превращается  $\sim 40\%$  радикалов типа I.

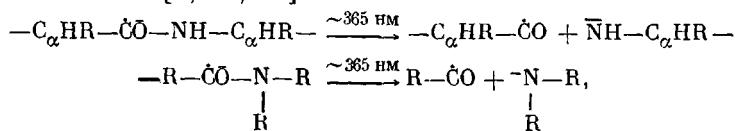
Рассмотрим фотопривращение макрорадикала  $\text{CO}-\text{NH}-\text{C}_\alpha\text{HR}$  — второго радикала, образующегося при механической деструкции фибронина шелка при 77 К. Форма спектра этого радикала не зависит от типа соседнего аминокислотного остатка. Это триплет с соотношением интенсивностей компонент 1 : 1 : 1 [8, 13]. Было показано, что радикалы II под действием света с  $\lambda=330-390$  нм полностью превращаются в радикалы, имеющие синглетный спектр ЭПР с шириной около 17 Гс [8], которые не чувствительны к свету данного диапазона длин волн, а также и к свету с  $\lambda>>520$  нм. В связи с этим обратим внимание на изменение ширины центральной компоненты в спектрах, приведенных на рис. 1. В исходном спектре (рис. 1,  $a$ ) ширина центральной компоненты  $\Delta H_c \approx 8$  Гс. После завершения фотопривращения при действии света с  $\lambda=330-390$  нм ширина синглета составляет  $\sim 17$  Гс (рис. 1,  $b$ ) и определяется спектром ЭПР радикалов, образующихся из радикалов II [8]. Ширина центральной компоненты структурированного спектра, возникающего после завершения

фотореакции под действием света с  $\lambda > 520$  нм, составляет  $16 \pm 0,3$  Гс (рис. 1, в). И в дальнейшем при облучении светом с  $\lambda = 330-390$  и  $> 520$  нм остается постоянной и близкой к 16 Гс (рис. 1, д). Это свидетельствует о том, что образовавшиеся в первой фотореакции из радикалов II радикалы IV не чувствительны к свету с  $\lambda = 330-390$  и  $> 520$  нм. Можно считать, что величина 16 Гс является более точной для ширины синглетного спектра радикала IV. В суммарном синглетном спектре (рис. 1, б, г) вторым слагающим является спектр с  $\Delta H \approx 14$  Гс (радикал III). На рис. 1, в, д вторым из основных является спектр радикалов типа I, ширина центральной компоненты которого  $\sim 9$  Гс. В этом случае (рис. 1, в, д) возможное уширение, видимо, будет меньше.

Что же представляет собой фотореакция радикала II и какова природа образующегося радикала IV? По-видимому, при действии света с  $\lambda = 330-390$  нм в макрорадикале II происходит разрыв пептидной связи C—N по реакции



В этой реакции оба электрона связи C—N остаются на атоме азота. Возможность такого превращения радикала II подтверждается существованием подобных реакций, изученных ранее на УФ-облученных белках и модельных системах [9, 10, 14]



где R=H или CH<sub>3</sub>.

Не чувствительный к свету синглетный спектр с  $\Delta H = 16 \pm 0,3$  Гс мы связываем с радикалом CO<sup>+</sup>.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Бутягин П. Ю. Докл. АН СССР, 1961, т. 140, № 1, с. 145.
- Ульберт К., Бутягин П. Ю. Докл. АН СССР, 1963, т. 149, № 5, с. 1194.
- Абагян Г. В., Бутягин П. Ю. Биофизика, 1964, т. 9, № 2, с. 180.
- Абагян Г. В., Бутягин П. Ю. Докл. АН СССР, 1964, т. 154, № 6, с. 1444.
- Закревский В. А., Баптизманский В. В., Томашевский Э. Е. Физика твердого тела, 1968, т. 10, № 6, с. 1699.
- Дубинская А. М., Сегалова Н. Е., Белавцева Е. М., Кабанова Т. А., Истраков Л. П. Биофизика, 1980, т. 25, № 4, с. 610.
- Дубинская А. М., Сегалова Н. Е., Златопольский А. Д. Биофизика, 1982, т. 27, № 2, с. 225.
- Льзов К. М., Гасымов О. К., Мамедов Ш. В. Высокомолек. соед. А, 1984, т. 26, № 9, с. 1903.
- Азизова О. А. Дис. на соискание уч. ст. докт. биол. наук. М.: ИХФ АН СССР, 1979. 500 с.
- Каюшин Л. П., Грибова З. П., Азизова О. А. ЭПР фотопроцессов биологических соединений. М.: Наука, 1973.
- Судьбина Е. Н., Азизова О. А. Биофизика, 1973, т. 18, № 6, с. 998.
- Судьбина Е. Н., Азизова О. А., Каюшин Л. П. Биофизика, 1973, т. 18, № 4, с. 611.
- Yutaka Kirino, Hitoshi Taniguchi. J. Amer. Chem. Soc., 1976, v. 98, № 17, p. 5089.
- Ильясова В. Б., Азизова О. А. Биофизика, 1971, т. 16, № 1, с. 11.

Институт химической физики  
АН СССР

Поступила в редакцию  
4.V.1983

Институт физики АН АзССР

#### PHOTOREACTIONS OF PRIMARY MACRORADICALS DURING MECHANICAL DEGRADATION OF SILK FIBROINE

*L'vov K. M., Gasymov O. K., Mamedov Sh. V.*

#### Summ a ry

Photoreactions of primary  $-\text{NH}-\text{C}_\alpha\text{HR}$  and  $\text{CO}-\text{NH}-$  macroradicals arising during mechanical degradation of silk fibroine at 77 K have been studied. Under the action of light with  $\lambda = 330-390$  nm in  $\text{CO}-\text{NH}-$  radical the rupture of the peptide bond proceeds with formation of the radical being unsensitive to light. In  $-\text{NH}-\text{C}_\alpha\text{HR}$  macroradical under the action of light the characteristic phototransformations proceed. These reactions confirm the earlier conclusion about the rupture of  $\text{C}_\alpha-\text{C}$  bond of the main peptide chain during mechanical degradation of silk fibroine.