

УДК 541.64:539.3

МЕХАНИЧЕСКАЯ ДЕСТРУКЦИЯ ФИБРОИНА ШЕЛКА ПРИ 77 К

Левов К. М., Гасымов О. К., Мамедов Ш. В.

Изучена механическая деструкция фибрillлярного белка фиброна шелка при 77 К. Показано, что первичным актом является разрыв связи $C_{\alpha}-C$ (остова пептидной цепи) и образование радикалов $-NH-C_{\alpha}H-$ и $CO-NH-$.

Систематическое изучение механической деструкции белков и синтетических высокомолекулярных соединений началось более двадцати лет назад [1–3]. Было твердо установлено [4–6], что механическая деструкция синтетических полимеров протекает по свободнорадикальному механизму. Первичным актом является разрыв определенных химических связей основной полимерной цепи и образование двух свободных радикалов при каждом разрыве. Далее следуют вторичные реакции первичных свободных радикалов друг с другом и с окружающими молекулами [6].

Механическая деструкция белков исследована сравнительно мало [3, 7–12]. В работе [3] впервые было прямо установлено, что при механической деструкции белков возникают свободные радикалы. В последующих работах [9, 12] показано, что во всех белках при соблюдении условий, снижающих эффективность вторичных радикальных реакций (малое время дробления и использование растворов белков), наблюдается спектр ЭПР триплетной формы с $\Delta H_p=22\pm 1$ Гс. Установлено, что образование первичных радикалов происходит в результате разрыва пептидной цепи белка [11, 12]. В работе [12] высказано предположение, что в коллагене, содержащем большое количество остатков глицина (30%), спектр ЭПР триплетной формы дают радикалы $C_{\alpha}H_2-CO^-$, возникающие при разрыве связи $N-C_{\alpha}$. Авторы работы [10] изучали механическую деструкцию шелка, в котором велико содержание остатков глицина и аланина, и пришли к выводу, что при деструкции могут разрываться как $N-C_{\alpha}-$, так и $C_{\alpha}-C$ связи пептидной цепи с образованием в основном радикалов типа $C_{\alpha}HR-CO^-$ или $-NH-C_{\alpha}H-$.

При гомолитическом разрыве любой связи в пептидной цепи белка должны появляться два разных радикала. Однако обнаружить спектр ЭПР второго радикала до настоящего времени не удавалось. Таким образом, вопрос о месте разрыва пептидной цепи белка при механической деструкции оставался открытым.

В настоящей работе определена химическая связь, по которой происходит разрыв пептидной цепи, установлена природа возникающих радикалов и изучены фотопреакции этих радикалов при 77 К.

Фибронин шелка имеет сравнительно простой аминокислотный состав (глицин 44,5%, аланин 29,3%, серин 12,1%, другие аминокислотные остатки 14,1% [13]). Это фибрillлярный белок с $M=4 \cdot 10^5$ [14]. В волокнах фиброна шелка имеются кристаллические и аморфные области. В кристаллических областях наблюдается складчато-слоистая структура с антипараллельными пептидными цепями [15, 16].

Фибронин шелка в жидким азоте измельчали ножницами на фрагменты длиной ~1 мм. При этом способе деструкции в отличие от деструкции в вибромельнице нет повторного воздействия на образовавшиеся радикалы, вероятность протекания вторичных радикальных реакций при 77 К снижена и не образуются радикалы перекисного типа. Из-за высокой чувствительности свободных радикалов к свету измельчение фиброна шелка проводили при слабом освещении.

Для измерения спектра ЭПР брали 10–20 мг измельченного белка. Спектры ЭПР измеряли при 77 К на спектрометре РЭ 1306. При изучении фотопреакции ради-

калов использовали ртутную лампу сверхвысокого давления мощностью 1000 Вт (ДРШ-1000) с водным фильтром толщиной 8 см. Необходимые спектральные области выделяли стеклянными фильтрами: область 330–390 нм фильтрами СЗС 23, УФС 6, область >520 нм фильтром ОС 11.

Спектр ЭПР измельченного фиброна шелка в жидком азоте показан на рис. 1, а. Он состоит из трех компонент. Расщепление между первой и второй компонентами $23,7 \pm 0,2$ Гц и между второй и третьей — $22,6 \pm 0,2$ Гц (в направлении увеличения магнитного поля). Ширина первой, второй и третьей компонент равна соответственно $8,6 \pm 0,2$; $8,1 \pm 0,1$ и $9,9 \pm 0,2$ Гц, а соотношение их амплитуд близко к $1,3 : 1,6 : 1$.

Действие светом с длиной волны в интервале 330–390 нм приводит к полному превращению исходного триплета в синглетный спектр ЭПР с

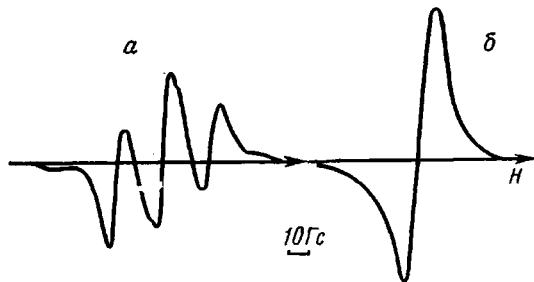


Рис. 1. Спектр ЭПР измельченного фиброна шелка до (а) и после облучения (б) светом с $\lambda=330$ – 390 нм. Измельчение и облучение образца, а также запись спектра проводили при 77 К

$\Delta H = 17,1 \pm 0,2$ Гц (рис. 1, б). Интегральная интенсивность спектра ЭПР при этом не меняется. Это превращение было подробно исследовано. За изменением триплета следили по первой и третьей компонентам. На эти линии накладываются крылья возникающего синглета, что учитывалось при анализе их ширины и амплитуды. Важно отметить, что исходный фиброн шелка не поглощает свет с $\lambda > 300$ нм. Кинетика уменьшения первой и третьей компонент триплета при действии света 330–390 нм приведена на рис. 2. Хорошо видно, что происходят две фотопреакции — быстрая и медленная. Быстрая реакция заканчивается через 2–3 мин после включения света. Измерение ширины первой и третьей компонент триплета показало, что через 3 мин освещения она стала составлять $7,5 \pm 0,5$ Гц. Исходные параметры триплета (разное расщепление, разная ширина линий, соотношение интенсивностей компонент), особенность кинетики гибели радикалов при облучении светом и изменение ширины компонент показывают, что в исходный спектр ЭПР измельченного при 77 К фиброна шелка вносят вклад спектры радикалов двух типов. И те и другие радикалы при действии света длиной волны 330–390 нм превращаются в радикалы с синглетным спектром ЭПР.

Анализ изменений, происходящих в центральной части спектра ЭПР при протекании этих фотопреакций, подтверждает высказанное предположение. На рис. 3 приведена кривая изменения ширины центральной компоненты спектра по мере превращения триплета в синглет. Ширина компоненты триплета, до включения света составлявшая $3,1 \pm 0,1$ Гц, растет вначале быстро до значения ~ 14 Гц, а затем медленно до значения $17,1 \pm 0,2$ Гц, после чего остается неизменной до конца фотопреакции. Быстрое увеличение ширины центральной компоненты исходного спектра ЭПР до ~ 14 Гц происходит за время, равное времени быстрой фотопреакции перехода триплета в синглет. Далее по мере накопления продукта медленной реакции ширина центральной линии вырастает до $17,1 \pm 0,2$ Гц. Это означает, по-видимому, что в ходе быстрой реакции возникают радикалы, имеющие синглетный спектр ЭПР с $\Delta H \approx 14$ Гц, а в ходе медленной фотопреакции образуются радикалы с синглетным спектром ЭПР с шириной линии ~ 17 Гц. Таким образом, характер изменения ширины центральной

компоненты триплета при превращении в синглетный спектр ЭПР подтверждает вывод о том, что исходный спектр ЭПР представляет собой сумму двух спектров.

Анализ радикалов, которые могут возникнуть при разрыве той или иной связи пептидной цепи, показывает, что только в случае разрыва свя-

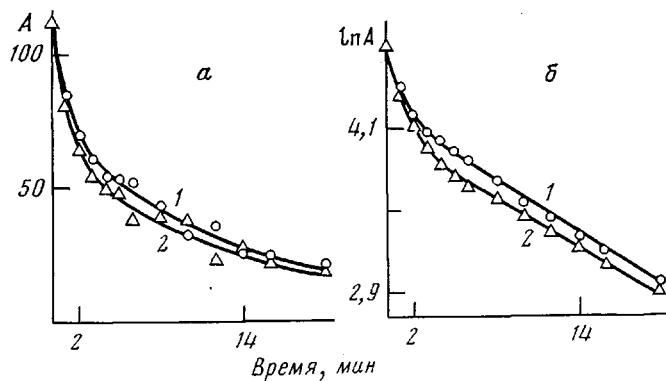


Рис. 2. Кинетика изменения амплитуд первой (1) и третьей (2) линий спектра ЭПР измельченного при 77 К фибронина шелка под действием света с $\lambda=330-390$ нм (а) и полулогарифмические анаморфозы кинетических кривых (б). Начальная амплитуда третьей линии приведена к начальной амплитуде первой с соответствующим пересчетом всех точек кривой 2

зи $C_{\alpha}-C$ получатся радикалы, наблюдаемые в эксперименте. В оставе пептидной цепи имеется только три типа связей: $C-N$, $N-C_{\alpha}$, $C_{\alpha}-C$. В случае разрыва связи $C-N$ должны образоваться макрорадикалы $-C_{\alpha}HR-CO$ и $NH-C_{\alpha}HR-$. Радикал $-C_{\alpha}HR-CO$ хорошо изучен [17, 18]. Он имеет синглетный спектр ЭПР с $\Delta H=13\pm 2$ Гц. При действии света с $\lambda>520$ нм такой радикал превращается в радикал типа $-NH-C_{\alpha}HR$ [17, 18]. В центре исходного спектра ЭПР измельченного фибронина шелка линия с $\Delta H=13\pm 2$ Гц отсутствует (рис. 1, а) и никаких изменений при действии света с $\lambda>520$ нм в спектре не происходит. Спектр ЭПР радикала $NH-C_{\alpha}HR-$, который, видимо, должен представлять собой дублет триплетов, в исходном сигнале не наблюдается. Все это доказывает, что при механической деструкции фибронина шелка не происходит разрыва заметного количества связей $C-N$.

В случае разрыва связи $N-C_{\alpha}$ должны образоваться макрорадикалы $-CO-NH$ и $C_{\alpha}HR-CO-$. Радикал $-CO-NH$ должен иметь спектр ЭПР, представляющий собой дублет триплетов [18]. Радикал $C_{\alpha}HR-CO-$ не чувствителен к свету с $\lambda>320$ нм [17, 18]. Этих сведений достаточно, чтобы сделать вывод о том, что при измельчении фибронина шелка при 77 К не происходит разрыва заметного количества связей $N-C_{\alpha}$.

При разрыве связи $C_{\alpha}-C$ возникают макрорадикалы $-NH-C_{\alpha}HR$ (I) и $CO-NH-$ (II). Радикал I хорошо изучен [17, 18]. Вид спектра ЭПР его зависит от типа аминокислотного остатка. В фибронине шелка, 45% аминокислотных остатков которого представляют собой глицил, а 29% — аланил, вид спектра будет определяться суммой триплета ($1:2:1$, $\Delta H_p \approx 20$ Гц, $\Delta H_k \approx 9$ Гц, $g=2,003$) и квинкета ($1:4:6:4:1$, $\Delta H_p \approx 22$ Гц, $\Delta H_k \approx 9$ Гц, $g=2,003$) [18]. Компоненты триплета хорошо накладываются

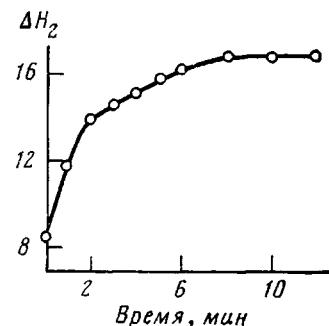
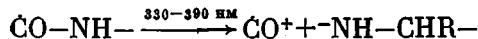


Рис. 3. Кинетика изменения ширины центральной линии спектра ЭПР измельченного при 77 К фибронина шелка под действием света с $\lambda=330-390$ нм

на три средние компоненты квинкета, и в первом приближении с учетом относительного содержания аминокислотных остатков соотношение компонент в суммарном спектре будет 1 : 10 : 18 : 10 : 1. Крайние компоненты этого спектра слабые. Три средние компоненты могут составлять часть исходного спектра ЭПР измельченного при 77 К фибропина шелка. Ранее было показано [17, 18], что радикал I при действии света в области 330–400 нм превращается в радикал $-\text{C}_\alpha\text{HR}-\text{CO}$, имеющий синглетный спектр ЭПР с $\Delta H=13\pm 2$ Гц. Именно такое фотопревращение наблюдается в случае фибропина шелка (рис. 1) при протекании быстрой фотопрерации.

Радикал II ранее не исследовался. Однако в работах [19, 20] изучен радикал $\text{CO}-\text{NH}_2$. Показано, что он имеет плоскую структуру и один атом водорода расположен по одну сторону с кислородом относительно связи $\text{C}-\text{N}$, а второй — по разные. Это σ — радикал с g -фактором 2,0016, с расщеплением на атоме азота 22 Гц, на первом атоме водорода 31 Гц и на втором — 1,3 Гц. В пептидной группе белка первый водород отсутствует. Таким образом, радикал $\text{CO}-\text{NH}-$, видимо, будет иметь спектр ЭПР триплетной формы с соотношением интенсивностей компонент 1 : 1 : 1, расщеплением ~22 Гц и $\Delta H\simeq 7,5$ Гц. Компоненты этого спектра ЭПР хорошо накладываются на компоненты спектра радикала I. Как было показано (рис. 1–3), при действии света 330–390 нм радикал II превращается в радикал, имеющий синглетный спектр ЭПР с $\Delta H\simeq 17$ Гц. Мы предполагаем, что реакцию фотопревращения радикала II можно записать в виде



Образующиеся в последней реакции продукты не обладают фоточувствительностью. Синглетный спектр ЭПР шириной ~17 Гц, появление которого наблюдается в эксперименте, мы связываем с возникновением радикала CO^+ .

Исходя из параметров спектров ЭПР первичных радикалов, возникающих при механической деструкции фибропина шелка, определим соотношение амплитуд компонент суммарного спектра ЭПР. Считая, что при разрыве пептидной цепи возникает равное количество радикалов типа I и II, можно записать уравнение

$$3I_1(\Delta H_1)^2=4I_2(\Delta H_2)^2+16I_3(\Delta H_3)^2,$$

где I_1 , I_2 , I_3 — амплитуды первых компонент триплета 1 : 1 : 1, триплета 1 : 2 : 1 и квинкета соответственно, а ΔH — ширина компоненты.

Учитывая относительное количество глицина и аланина в фибропине шелка, можно записать

$$29 \cdot 4I_2(\Delta H_2)^2=45 \cdot 16I_3(\Delta H_3)^2$$

Откуда $I_2\simeq 6$, I_3 . Таким образом, $I_1\simeq 19I_3$.

Итак, в данном приближении получим следующее соотношение амплитуд компонент 1 : 29 : 37 : 29 : 1.

При больших усилениях наблюдается крайняя компонента квинкета, амплитуда которой в 32 раза меньше амплитуды первой линии триплетного спектра ЭПР измельченного фибропина шелка. Соотношение амплитуд первой и второй линий триплета тоже хорошо согласуется с теоретическим. Меньшее значение высокопольной компоненты частично обусловлено анизотропией радикалов $\text{CO}-\text{NH}-$.

Итак, механическая деструкция фибропина шелка при 77 К приводит к разрыву именно связи $\text{C}_\alpha-\text{C}$ пептидной цепи и к образованию радикалов $-\text{NH}-\text{C}_\alpha\text{HR}$ и $\text{CO}-\text{NH}-$, которые при действии света 330–390 нм подвергаются фотопревращениям. Разрывов заметного количества других связей не происходит.

Триплетный спектр ЭПР, наблюдаемый ранее при механической деструкции белков при 77 К, по своим параметрам очень близок к спектру, полученному в настоящей работе. Видимо, разрыв связи $\text{C}_\alpha-\text{C}$ является основным процессом при механической деструкции различных белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бутягин П. Ю., Берлин А. А., Калмансон А. Э., Блюменфельд Л. А. Высокомолек. соед., 1959, т. 1, № 6, с. 865.
2. Бреслер С. Е., Журков С. Н., Казбеков Е. Н., Саминский Е. М., Томашевский Э. Е. Ж. техн. физики, 1959, т. 29, с. 358.
3. Бутягин П. Ю. Докл. АН СССР, 1961, т. 140, № 1, с. 145.
4. Бутягин П. Ю., Колбаев И. В., Радциг В. А. Физика твердого тела, 1963, т. 5, № 8, с. 2257.
5. Журков С. Н., Савостин А. Я., Томашевский Э. Е. Докл. АН СССР, 1964, т. 159, № 2, с. 303.
6. Бутягин П. Ю., Дубинская А. М., Радциг В. А. Успехи химии, 1969, т. 38, № 4, с. 593.
7. Ульберт К., Бутягин П. Ю. Докл. АН СССР, 1963, т. 149, № 5, с. 1194.
8. Абагян Г. В., Бутягин П. Ю. Биофизика, 1964, т. 9, № 2, с. 180.
9. Абагян Г. В., Бутягин П. Ю. Докл. АН СССР, 1964, т. 154, № 6, с. 1444.
10. Закревский В. А., Балтизманский В. В., Томашевский Э. Е. Физика твердого тела, 1968, т. 10, № 6, с. 1699.
11. Дубинская А. М., Сегалова Н. Е., Белавцева Е. М., Кобанова Т. А., Истронов Л. П. Биофизика, 1980, т. 25, № 4, с. 610.
12. Дубинская А. М., Сегалова Н. Е., Златопольский. Биофизика, 1982, т. 27, № 2, с. 610.
13. Lotz B., Cesari F. C. Biochimie, 1979, v. 61, № 2, p. 205.
14. Vincenzo T., Ginseppina C., Franco P., Barbara C., Angelo P., Eligio P. Makromolek. Chem., 1980, B. 181, № 6, S. 1159.
15. Marsh R. E., Corey R. B., Pauling L. Biochem. Biophys. Acta, 1955, v. 16, № 1, p. 1.
16. Риг А. Современные проблемы биофизики, 1961, т. 1, с. 64.
17. Каюшин Л. П., Грибова З. П., Азизова О. А. ЭПР фотопроцессов биологических соединений. М.: Наука, 1973.
18. Азизова О. А. Дис. на соискание уч. ст. докт. биол. наук. М.: ИХФ АН СССР, 1979. 500 с.
19. Bower H., McRae J., Symons M. C. R. J. Chem. Soc. A, 1971, № 14, p. 2400.
20. Livingston R., Zeldes H. J. Chem. Phys., 1967, v. 47, № 10, p. 4173.

Институт химической
физики АН СССР

Институт физики АН АзССР

Поступила в редакцию
4.IV.1983

MECHANICAL DEGRADATION OF SILK FIBROINE AT 77K

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

Summary

The mechanical degradation of fibrillar protein silk fibroine at 77 K has been studied. The primary act is shown to be the rupture of C_{α} -C bond (backbone of the peptide chain) and formation of $-NH-C_{\alpha}HR$ and $\text{CO}-NH-$ radicals.