

УДК 577.322

© 1992 г.

А.Р. ПАНЧЕНКО, К.В. ШАЙТАН

О МЕХАНИЗМЕ ВЛИЯНИЯ ДАВЛЕНИЯ НА ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНУЮ ДИНАМИКУ БЕЛКОВ

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119899

Развиваются физические представления о влиянии давления на конформационную динамику и мессбауэровские спектры белков. Проанализированы экспериментальные данные по влиянию давления на величину вероятности эффекта Мессбауэра, полученные методом рэлеевского рассеяния мессбауэровского излучения. Определены значения активационного объема ($\sim 10\text{--}20 \text{ \AA}^3$) для конформационной подвижности сывороточного альбумина человека.

Внешнее давление наряду с температурой и степенью гидратации является одним из важнейших факторов, влияющих на динамику белков и их функциональную активность. Варьирование температуры и давления позволяет отдельно изучать тепловые и объемные эффекты в динамике и функционировании белков, последние из которых весьма мало исследованы.

Согласно имеющимся физическим представлениям о динамике биомакромолекул увеличение давления должно приводить, в целом, к увеличению времен релаксаций конформационных движений и к уменьшению их амплитуды [1–3]. Ранее [4] методом рэлеевского рассеяния мессбауэровского излучения (РРМИ) изучали влияние внешнего давления (до 2 кбар) на внутримолекулярную динамику сывороточного альбумина человека (САЧ). Образец САЧ представлял собой кристаллический порошок со степенью гидратации 0,65 г воды на 1 г белка. Все измерения проводили при комнатной температуре.

На рис. 1 представлена зависимость вероятности эффекта Мессбауэра (f') от давления с учетом вклада гидратационной воды [4]. Изменение f' под действием давления можно оценить в рамках дебаевской модели твердого тела, согласно которой при $T > \theta_D$ (θ_D для белков 110–140 К [6]) $\langle x^2 \rangle = \frac{kT}{m\omega_0^2}$, где m – масса движущегося фрагмента белка, ω_0 – собственная частота колебаний фрагмента. Из соотношения для константы Грюнайзена:

$$\gamma = - \frac{d(\ln \omega)}{d(\ln V)}$$

и изотермической сжимаемости: $\beta_T = - \frac{1}{V_0} \left[\frac{dV}{dP} \right]_T$ получаем при малых βP [4, 5]:

Принятые сокращения: РРМИ – рэлеевское рассеяние мессбауэровского излучения, САЧ – сывороточный альбумин человека.

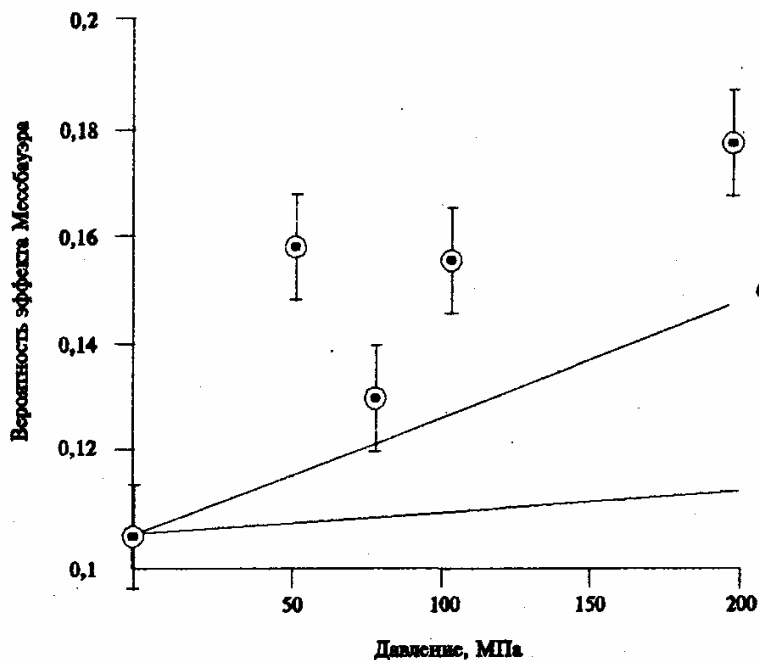


Рис. 1. Точки – зависимость от давления вероятности эффекта Мессбауэра (f'). f' связана с долей упругого рассеяния f_R соотношением: $f_R = 0,95 f'$. а и б – зависимости f' от давления в рамках модели твердого тела Дебая при различных значениях параметра $\gamma\beta_T$:
а) $\gamma\beta_T = 0,85 \cdot 10^{-10} \text{ Па}^{-1}$ ($\beta_T = 14,1 \cdot 10^{-11} \text{ Па}^{-1}$, $\gamma = 0,6$);
б) $\gamma\beta_T = 4,38 \cdot 10^{-10} \text{ Па}^{-1}$ ($\beta_T = 14,6 \cdot 10^{-11} \text{ Па}^{-1}$, $\gamma = 3$)

$$\langle x^2 \rangle_p = \frac{k T}{m \omega_0^2 (1 + \gamma \beta_T P)^2} \quad (1)$$

Индексы p и 0 относятся к давлению p и нулевому давлению соответственно. Тогда вероятность эффекта Мессбауэра в рамках модели твердого тела запишется в виде:

$$f' = e^{-Q^2 \langle x^2 \rangle} \sim e^{-a_0^2} (1 + 2 a_0^2 \gamma \beta_T P), \quad (\gamma \beta_T P \ll 1), \quad (2)$$

где $a_0^2 = \frac{Q^2 k T (T = 300 \text{ K})}{m \omega_0^2 (P = 0)}$; $|Q|^2 = 4,3 \text{ \AA}^{-2}$.

В отсутствие внешнего давления экспериментально измеренная величина $f_0' = 0,105$ и эффективное значение относительной амплитуды $a_0^2 = 2,25$.

Значения γ для белков точно не известны. Расчетное значение γ для белков составляет $0,6 \pm 0,25$ [6]. Для молекулярных кристаллов $\gamma = 3$ [7]. Величина β_T , определенная для сывороточного альбумина быка методом измерения скорости ультразвука, составила $\beta_T = 14,6 \cdot 10^{-11} \text{ Па}^{-1}$ [8]. Это значение близко к $\beta_T = (17 \pm 3) \cdot 10^{-11} \text{ Па}^{-1}$ для растворов белка, полученному с учетом гидратационного вклада в полную сжимаемость белка [9]. Из механических измерений модуля Юнга кристаллов [10] была определена β_T , которая также составила $\beta_T = 17 \cdot 10^{-11} \text{ Па}^{-1}$. Следует отметить, что в данном случае не учитывается гетерогенность глобулы по сжимаемости и при небольшом относительном изменении объема глобулы можно пренебречь зависимостью $\beta_T(V)$.

Поскольку β_T и γ связаны между собой соотношением $\gamma\beta_T = \frac{\alpha_V}{c_V \rho}$, то из измеренных характеристик белка – коэффициента теплового расширения $\alpha_V = 1,4 \cdot 10^{-4} \text{ град}^{-1}$, теплоемкости $c_V = 0,28 \text{ кал/г} \cdot \text{град}$ и плотности белковой глобулы $\rho = 1,4 \text{ г/см}^3$ – получаем $\gamma\beta_T = 0,85 \cdot 10^{-10} \text{ Па}^{-1}$. В частности это соотношение выполняется для $\gamma = 0,6$ и $\beta_T = 14,1 \cdot 10^{-11} \text{ Па}^{-1}$. Модельная зависимость $f'(P)$ для крайних случаев $\gamma = 0,6$, $\beta_T = 14,1 \cdot 10^{-11} \text{ Па}^{-1}$ и $\gamma = 3$, $\beta_T = 14,6 \cdot 10^{-11} \text{ Па}^{-1}$ показана на рис. 1, а, б.

Как отмечалось ранее [4] и как видно из рис. 1 модель твердого тела плохо описывает экспериментальные данные даже при максимальных значениях параметров β_T и γ : давление сильнее влияет на внутримолекулярную динамику белка,

чем это следует из вышеприведенных оценок. Для понимания механизмов действия давления на белок необходимо, по-видимому, привлечение моделей конформационной подвижности.

В белке, как известно, имеется набор связанных элементов, различающихся по своим динамическим свойствам; так боковые группы образуют жидкообразную «опушку» вокруг спиральных участков каркаса. Плотность белковой глобулы сравнима с плотностью жидкостей и органических кристаллов и микроконформационные движения боковых групп с амплитудами больше $0,1 \text{ \AA}^2$ в такой конденсированной среде, какую представляет собой белок, требуют образования флуктуационной полости, характеризуемой свободной энергией активации ΔG^* [11].

Внутрибелковая эффективная микровязкость определяется величиной свободной энергии активации самодиффузии групп белка:

$$\eta_P = \eta_0 e^{\Delta G^*/kT}, \quad (3)$$

где ΔG^* может быть грубо определена как работа по образованию полости радиусом R_0 . Энергия ΔG^* связана с преодолением сил поверхностного натяжения и работой расширения при образовании полости объемом $V^* = 4/3\pi R_0^3$ против сил внешнего давления.

$$\Delta G^* = 4\pi R_0^2 \sigma + 4/3\pi R_0^3 P, \quad (4)$$

где R_0 – критический размер полости, необходимой для процесса самодиффузии групп белка. R_0 не зависит от величины внешнего давления, σ – эффективный коэффициент поверхностного натяжения белковой среды. Времена корреляции движений групп белка пропорциональны микровязкости η_P и для зависимости τ_c от давления получаем следующее выражение:

$$\tau_c = \tau_0 e^{\Delta G^*/kT} = \tau_0 e^{\Delta G_0^*/kT} e^{V^* P/kT} = \tau_0' e^{\alpha P}; \quad \alpha = V^*/kT. \quad (5)$$

Вероятность эффекта Мессбауэра для групп, подвижность которых осуществляется по механизму ограниченной диффузии, описывается формулой [12]:

$$f' = 1 - a^2 e^{-a^2} \int_0^1 y^{n(P,T)} e^{a^2 y} dy, \quad (6)$$

где $n(P, T) = \tau_c/2\tau_N = n_0(T) e^{\alpha P}$.

Используя выражение для τ_c , получим:

$$f' = 1 - a^2 e^{-a^2} \int_0^1 \exp \{a^2 y + n_0 e^{\alpha P} \ln y\} dy \quad (7)$$

при $n_0 \rightarrow 0 \quad f' \rightarrow e^{-a^2}$.

Для описания экспериментальных зависимостей $f'(P)$ необходимо оценить возможный интервал изменения параметров a^2 и n_0 . Как было показано ранее [13], время корреляции конформационных движений в САЧ не превышает десятков наносекунд и соответственно $n_0 < 0,3$. Исследовали два случая зависимости амплитуд a^2 от давления. В первом (1) предполагается, что $\gamma\beta_T = 0,85 \cdot 10^{-10} \text{ Па}^{-1}$ (например, $\beta_T = 14,1 \cdot 10^{-11} \text{ Па}^{-1}$, $\gamma = 0,6$), во втором (2) $\gamma\beta_T = 4,38 \cdot 10^{-10} \text{ Па}^{-1}$ (например, $\gamma = 3$, $\beta_T = 14,6 \cdot 10^{-11} \text{ Па}^{-1}$).

Значения $a_0^2 = a^2 (P = 0)$ нельзя определить однозначно из величины $f_0' (P = 0)$, поскольку согласно формуле (7) f' зависит как от a_0^2 , так и от n_0 . Приближение $n_0 = 0$, приводящее к формуле для твердого тела $f' = e^{-a}$, даже при нулевом давлении не вполне корректно в нашем случае, и a_0^2 будет зависеть от величины параметра n_0 . Была установлена приблизительно линейная зависимость между a_0^2 и n_0 , удовлетворяющая условию $f' (P = 0) = 0,105$.

В результате вычисления f' при различных значениях параметров n_0 и V^* в предположениях (1, 2) были построены поверхности зависимостей f' от давления и объема V^* , давления и n_0 при фиксированных граничных значениях параметров n_0 и V^* соответственно (рис. 2, 3). Из рисунков видно, что f' практически линейно растет с увеличением P до 2 кбар. Расчет показывает, что в районе реально

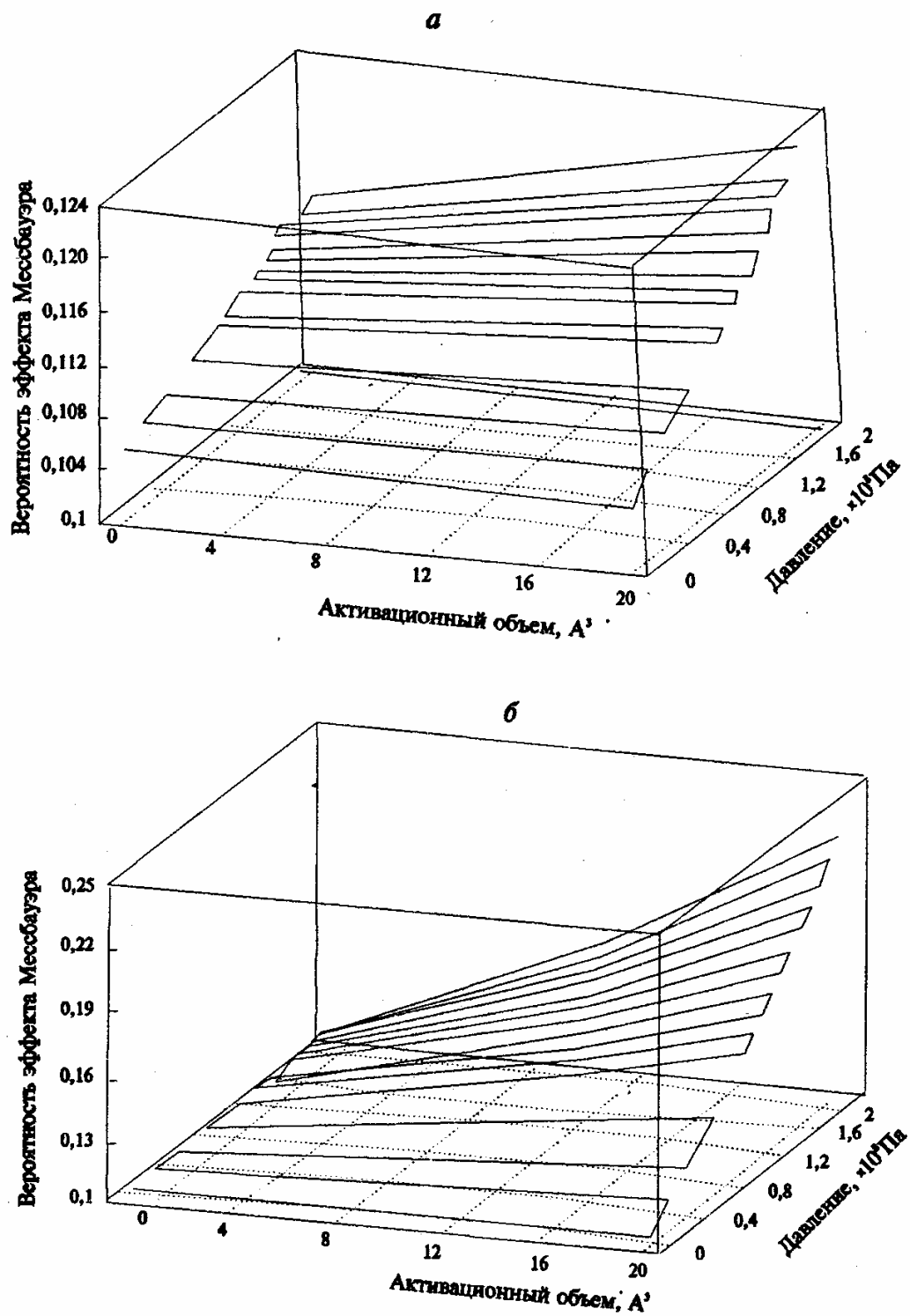


Рис. 2. Поверхности зависимости вероятности эффекта Мессбауэра от давления и активационного объема V^* для случая $\gamma\beta_T = 0,85 \cdot 10^{-10} \text{ Па}^{-1}$ при различных значениях параметра n_0 : $n_0 = 0,01$ (а), $n_0 = 0,3$ (б)

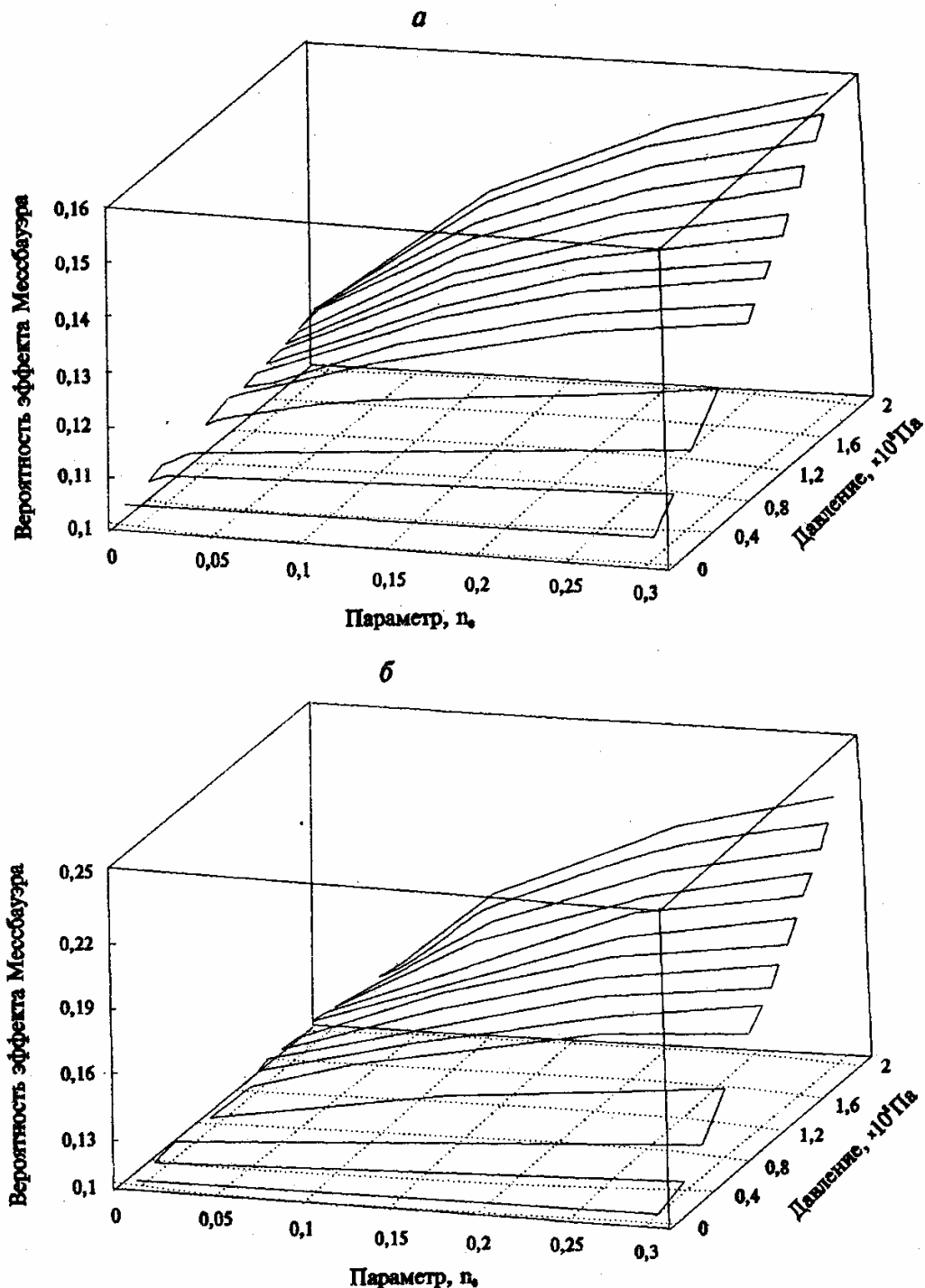


Рис. 3. Поверхности зависимости вероятности эффекта Мессбауэра от давления и параметра n_0 для случая $\gamma\beta_T = 0,85 \cdot 10^{-10} \text{ Па}^{-1}$ при различных значениях активационного объема V^* : $V^* = 10 \text{ Å}^3$ (а) и $V^* = 20 \text{ Å}^3$ (б)

допустимых значений параметров ($0,05 \leq n_0 \leq 0,3$, $V^* < 100 \text{ Å}^3$) модельная зависимость $f'(P)$ попадает в область экспериментальных точек $f'(P)$ (рис. 1) при параметрах модели V^* и n_0 , ограниченных на плоскости (V^*, n_0) значениями:

1. 10 Å^3 ($6 \text{ см}^3/\text{моль}$) $\leq V^* \leq 20 \text{ Å}^3$ ($12 \text{ см}^3/\text{моль}$); $0,1 \leq n_0 \leq 0,3$;
2. 10 Å^3 ($6 \text{ см}^3/\text{моль}$) $\leq V^* \leq 20 \text{ Å}^3$ ($12 \text{ см}^3/\text{моль}$); $0,05 \leq n_0 \leq 0,1$.

Полученное значение $R_0 \sim 1,5 \text{ Å}$ ($V^* = 15 \text{ Å}^3$) (в предположении сферической конфигурации полости) близко по своему значению к R_0 для некоторых органических растворителей [14]. Кроме того, величина $V^* \approx 10 \text{ см}^3/\text{моль}$ близка по своему значению к экспериментально определенной величине активационного объема для реакции связывания O_2 миоглобином и гемоглобином, которая составила $8 \text{ см}^3/\text{моль}$ (для Mb) и $5 \text{ см}^3/\text{моль}$ (для Hb) [1].

Отметим, что флуктуации объема молекулы САЧ выражаются через β_T : $(\delta V)^2 = kTV\beta_T$. При $\beta_T = 14,6 \cdot 10^{-11} \text{ Па}^{-1}$ и V (объем молекулы САЧ) $= 10^5 \text{ \AA}^3$ получаем $\delta V = 240 \text{ \AA}^3$. Объем флуктуационной полости V^* по крайней мере на порядок меньше δV . Следует, однако, учитывать, что объем δV распределен примерно равномерно по всей глобуле и на каждую группу приходится доля δV много меньшая V^* . Поэтому для образования полости объемом V^* (например $V^* = 10^3 \text{ \AA}^3$) требуется энергия активации. По данным о температурной зависимости времен конформационной релаксации [12, 15] энергия активации составляет примерно 5 ккал/моль. Согласно используемой концепции при нулевом давлении эта энергия идет на образование поверхности полости с $S = 4\pi R_0^2$. При $R_0 = 1,5 \text{ \AA}$ получим для эффективного поверхностного натяжения $\sigma = 0,117 \text{ Н/м}$, что по порядку величины совпадает с типичными значениями σ для жидкостей.

В заключение благодарим И.П. Суздалева и Ю.Ф. Крупянского за полезное обсуждение результатов и любезно предоставленную возможность ознакомиться с их работой [4] до ее опубликования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Fraunfelder H., Akberding N.A., Ansari A. et al. // J. Phys. Chem. 1990. V. 94. P. 1024–1037.*
2. *Рубин А.Б., Кононенко А.А., Шайтан К.В. // Итоги науки и техники. Сер. биофизика. Т. 21. М.: ВИНТИ, 1987.*
3. *Шайтан К.В. // Молекуляр. биология. 1992. Т. 26. С. 264–284.*
4. *Суздалев И.П., Куринов И.В., Лившиц Л.Д., Крупянский Ю.Ф., Гольданский В.И. // Докл. АН СССР. 1991. Т. 32. С. 842–845.*
5. *Борн М., Кунь Х. Динамическая теория кристаллических решеток. М.: ИЛ, 1958.*
6. *Морозов В.Н., Морозова Т.Я. // Равновесная динамика структуры биополимеров. Пущино. 1990. С. 101–114.*
7. *Китайгородский А.И. Молекулярные кристаллы. М.: Наука, 1971.*
8. *Gekko K., Hasegawa Y. // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 6563–6571.*
9. *Харакоз Д.П. // Равновесная динамика структуры биополимеров. Пущино. 1990. С. 114–123.*
10. *Morozov V.N., Morozova T.Ya. // Biopolymers. 1981. V. 20. P. 451–467.*
11. *Френкель Я.И. // Кинетическая теория жидкостей. Л.: Наука, 1975.*
12. *Шайтан К.В., Рубин А.Б. // Молекуляр. биология. 1980. Т. 14. С. 1323–1335.*
13. *Упоров И.В., Басовец С.К., Шайтан К.В., Макаров Е.Ф., Рочев В.Я. // Хим. физика. 1990. Т. 9. С. 26–32.*
14. *Thomas M.M., Drickamer H.G. // J. Chem. Phys. 1981. V. 76. P. 3198–3204.*
15. *Крупянский Ю.Ф., Шайтан К.В., Гольданский В.И., Куринов И.В., Рубин А.Б., Суздалев И.П. // Биофизика. 1987. Т. 32. С. 761–774.*

Поступила в редакцию
19.II.1992

A.R. PANCHENKO, K.V. SHAITAN

THE MECHANISM OF PRESSURE EFFECT ON THE PROTEIN DYNAMICS

M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119899

The physical mechanisms of pressure influence on the protein dynamics and parameters of Mossbauer spectra were investigated. The pressure effects measured for human serum albumin using Rayleigh Scattering of Mossbauer Radiation techniques were described using the model of local diffusion. Parameters of this model were determined by analysing the experimental data. As a result an estimation of approximate values for activation volumes was performed. It was shown that the obtained values are well consistent with the previous experimental results.