

ЭФФЕКТ МЕССБАУЭРА, КОНФОРМАЦИОННАЯ ПОДВИЖНОСТЬ И ВЛАЖНОСТЬ БЕЛКОВ

К. В. ШАЙТАН, А. Б. РУБИН, Д. С. ЧЕРНАВСКИЙ, А. А. КИЛЯЧКОВ

*Биологический факультет Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова*

На основе моделей ограниченной диффузии и сегментального фазового перехода рассмотрена зависимость вероятности эффекта Мессбауэра в белках от их влажности. Восстановлена зависимость микровязкости η белка от концентрации воды C_{H_2O} .

Показано, что наблюдаемая зависимость $\eta(C_{H_2O})$ может быть интерпретирована в рамках теории концентрированных растворов (суспензий) макромолекул.

Резкое изменение конформационной подвижности белков в зависимости от температуры и влажности образцов было недавно продемонстрировано с помощью эффекта Мессбауэра [1]. Наряду с резким изменением вероятности эффекта (фактора f') изменяется также время корреляции спиновой метки и скорости окислительно-восстановительных процессов [1, 2]. Физическая интерпретация этого явления может быть основана на нескольких различных моделях внутренней динамики белка. В этой связи обсуждаются две модели: модель ограниченной диффузии фрагментов белковой цепи [3, 4] и модель фазового сегментального перехода [5].

В модели ограниченной диффузии для конформационной подвижности наблюдаемые при увеличении температуры эффекты связаны с резким (экспоненциальным) уменьшением внутреннего трения (внутренней микровязкости) для относительного и ограниченного движения фрагментов белковых цепей [3, 4]. Иными словами [6], изменение положения мессбауэровской метки непосредственно связано с флуктуациями плотности среды. Флуктуации плотности (со средней частотой $\nu \sim \frac{kT}{h} e^{-\Delta G^*/kT}$) приводят к образованию полостей (или «дырок», характеризующихся свободной энергией ΔG^*) рядом с фрагментом цепи, который получает возможность двигаться. Резкое увеличение фактора f' при уменьшении температуры или относительной влажности (P/P_s) (рис. 1) соответствует резкому уменьшению частоты флуктуаций и, следовательно, среднего квадратичного смещения мессбауэровского атома за время жизни (τ_i) возбужденного ядра ^{57}Fe ($\tau_i \sim 10^{-7}$ с) [1, 3, 4]. Как было показано [3, 4], в случае ограниченной диффузии вероятность резонансного поглощения γ -кванта определяется формулой:

$$f' = 1 - a^2 e^{-a^2} \int_0^1 e^{a^2 y + n \ln y} dy, \quad (1)$$

где $a^2 = kT/m\omega_0^2 \lambda^2$ — квадрат отношения полной амплитуды движения фрагмента цепи массой m к длине волны γ -кванта ($\lambda \approx 0,013$ нм). $n = \tau_i/2\tau_i \approx 6\pi\eta b\Gamma/2m\omega_0^2$ — отношение времени корреляции ограниченной

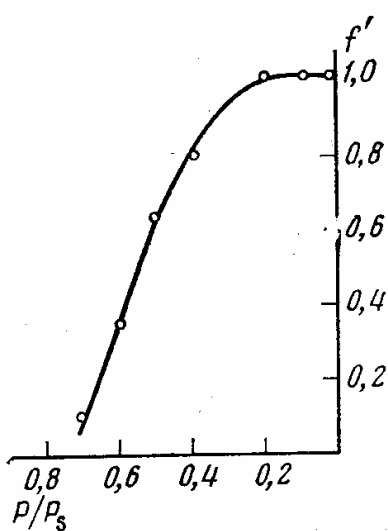


Рис. 1

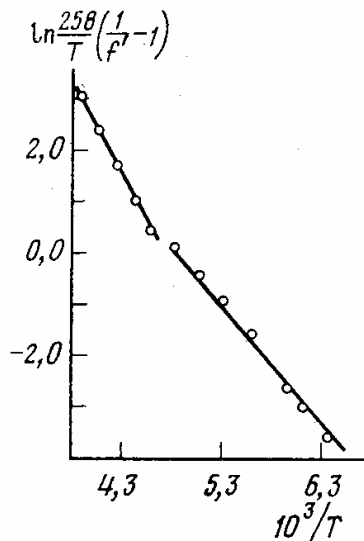


Рис. 2

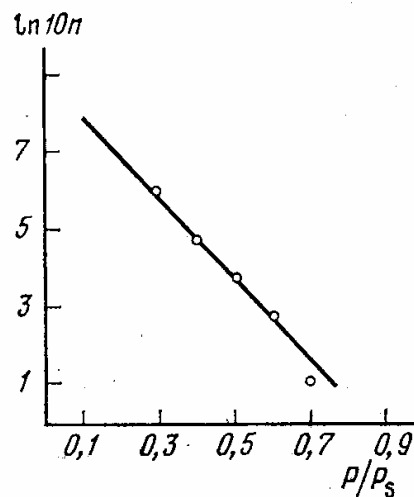


Рис. 3

Рис. 1. Зависимость вероятности резонансного поглощения от влажности образца [1]

Рис. 2. Линеаризация низкотемпературного участка зависимости $f'(T)$ [1] по формуле (3)

Рис. 3. Микровязкость как функция влажности белка. $n = 3\pi\eta b\Gamma/m\omega_0^2$, т. е. $\eta = 4 \cdot 10^2 n$ (н·с/м²) или $\eta = 4 \cdot 10^3 n$ (пуаз)

диффузии (τ_c) к времени жизни мёссбауэровского ядра: $\Gamma \approx 0,7 \cdot 10^7$ с⁻¹, b — размер колеблющегося фрагмента цепи, ω_0 — частота колебания в отсутствие затухания, $\eta = \eta_0 e^{\Delta G^*/kT}$ — эффективная микровязкость белка. ΔG^* — свободная энергия активации вязкого движения: $\Delta G^* = \epsilon - T\Delta S^*$.

Дальнейший анализ удобно провести, несколько упростив формулу (1). Оценивая интеграл по методу Лапласа, имеем

$$f' \approx [1 + a^2/n]^{-1} + e^{-a^2-n} [1 + n/a^2]^{-1}. \quad (2)$$

Формула (2) с удовлетворительной точностью аппроксимирует (1) в интересующем нас интервале значений параметров a^2 и n . Если n не слишком мало, то при достаточно больших значениях полной амплитуды движения мёссбауэровской метки ($a^2 \gg 1$) в (2) можно ограничиться лишь первым слагаемым:

$$f' \approx [1 + a^2/n]^{-1} = [1 + \Omega e^{-\Delta G^*/kT}]^{-1}, \quad (3)$$

где $\Omega = kT/3\pi\lambda^2\Gamma b\eta_0$. Это выражение формально совпадает с формулой для вероятности резонансного поглощения в растворах

$$f_s' = [1 + \Gamma_D/\Gamma]^{-1}, \quad (4)$$

где Γ_D — диффузионное уширение. Такое совпадение связано с тем, что в рамках сделанного приближения ($n \gg 1$) при переходе от (2) к (3) мёссбауэровский атом за время жизни $\tau_i = 1/\Gamma$ не достигает границы области диффузии и среднее квадратичное смещение $\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle \sim t/\tau_c$. Сильное влияние границ и отклонение от формулы (3) происходит при $n < 1$ [3, 4], когда за время излучения τ_i величина $\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle$ достигает своего предельного значения $a^2\lambda^2$. Следует подчеркнуть различие между формулами (1) и (4), описывающими вероятность резонансных процессов в случаях ограниченной и неограниченной диффузии соответственно. При уменьшении вязкости среды η в случае неограниченной диффузии спектр сильно уширяется, а интенсивность в центре уменьшается согласно (4). В случае же ограниченной диффузии уменьшение вязкости η ($n \rightarrow 0$) приводит лишь к уширению крыльев спектральной линии с со-

хранением узкого центрального пика с интегральной интенсивностью $e^{-\alpha^2}$ (см. (2)). Поэтому, используя ниже в расчетах формулу (3), необходимо помнить о пределах ее применимости. Однако сопоставление (3) с экспериментальными данными дает численные результаты, близкие к получаемым с помощью точной формулы (1). Соответствующий график приведен на рис. 2. Энергия активации ограниченной диффузии ε , определенная по низкотемпературной части зависимости $f'(T)$ с помощью (3), составляет $\varepsilon \approx 21$ кДж/моль (или 5 ккал/моль), что совпадает с вычислениями по точной формуле (1) [3, 4]. В более высокотемпературной области зависимость, приведенная на рис. 2, отклоняется от линейной, что указывает на переход в область значений $n < 1$ и на необходимость использования точной формулы (1) или введения поправочного члена (2).

Формула (3) в математическом отношении практически совпадает с выражением для фактора f' , полученным исходя из несколько иных физических предпосылок: сильно ангармонического осциллятора [8] и сегментального фазового перехода [5]:

$$f' \approx [1 + e^{-\Delta G/kT}]^{-1}, \quad (5)$$

где $\Delta G = \varepsilon - T\Delta S$ — разность свободных энергий для подвижной и мало-подвижной конформаций белка. Формально отличие (3) и (5) состоит в том, что в первом случае предэкспонент $\Omega \sim kT$ и зависит от характеристик мессбауэровского ядра. Во втором случае — $\Omega = 1$. Это различие не сказывается на величине определяемой энергии ε [5, 8], так как температурный ход зависимости $\ln\left(\frac{1}{f'} - 1\right)$ от $\frac{1}{T}$ (см. рис. 2) остается практически без изменений.

Перейдем далее к анализу эффектов, связанных с изменением влажности образцов. Как отмечалось ранее [3, 4], резкое увеличение вероятности резонансного поглощения f' при уменьшении влажности (рис. 1) может быть интерпретировано с точки зрения известных представлений о зависимости вязкости растворов макромолекул или суспензий от концентрации [6]. Зависимость эффективной микровязкости от влажности белка может быть восстановлена по зависимости $f'(P/P_s)$ с помощью формул (1) — (3).

Из рис. 3 следует, что вязкость η экспоненциально возрастает с уменьшением содержания воды в образце. Количественное описание несколько затруднено тем, что концентрация воды в препаратах нелинейно зависит от P/P_s . Однако, согласно данным [9], в узком интервале $0,35 < P/P_s < 0,5$ содержание воды

$$C_{H_2O} = \frac{m_{H_2O}}{m_{H_2O} + m_6} \approx \frac{V_{H_2O}}{V_{H_2O} + V_6}$$

линейно зависит от P/P_s ,

$$C_{H_2O} \approx 2,67 \left(\frac{P}{P_s} - 0,35 \right) + 0,25, \quad (6)$$

где m_{H_2O} и m_6 — масса воды и масса белка в препарате, V_{H_2O} и V_6 — соответствующие объемы (плотность белка принята $\sim 10^3$ кг/м³ (1 г/см³)). Так как, согласно рис. 3, $\eta \sim e^{-10P/P_s}$, то внутри рассматриваемого интервала значений P/P_s вязкость $\eta \sim e^{-3,75C_{H_2O}}$.

Относительная концентрация белка в системе $C_6 = 1 - C_{H_2O}$ и зависимость вязкости от концентрации C_6 имеет вид

$$\eta \sim e^{3,75C_6}. \quad (7)$$

Формула (7) допускает простую гидродинамическую интерпретацию. Согласно [6], вязкость суспензий и растворов макромолекул связана с

концентрацией растворенного вещества соотношением

$$\eta \sim e^{\xi C_0}, \quad (8)$$

где коэффициент ξ зависит от размера и формы взвешенных (растворенных) частиц.

Согласно Эйнштейну, для частиц сферической формы $\xi=2,5$. Для частиц малых размеров и вытянутой формы Кун и Гут получили [6]:

$$\xi \approx 2,5 + \frac{1}{16} (l/d)^2, \quad (9)$$

где l — длина, d — диаметр частиц.

Сравнение (9), (8) и (7) показывает, что при движении мёссбауэровской метки данный белковый препарат можно рассматривать как внутренний концентрированный раствор фрагментов макромолекул с отношением $l/d \approx 4,5$. Эти фрагменты (сегменты) являются относительно жесткими образованиями по крайней мере на временах $t \leq 10^{-7}$ с.

Если за диаметр фрагмента принять $d \approx 0,5$ нм, то длина l составит ~ 2 нм. Из общих соображений следует, что эффективные размеры фрагментов l и d должны увеличиваться при уменьшении температуры. При этом (при неслишком низких температурах) зависимость f' от влажности образца будет становиться более резкой и смещаться в область более высоких значений P/P_* .

Рассмотрим далее эффект резкого увеличения f' при уменьшении влажности с точки зрения модели фазового перехода [5] или сильно ангармонического осциллятора [8]. В этом случае зависимость f' (P/P_*) может быть объяснена как результат изменения конформации белка в точке перехода. При этом предполагается, что существуют две формы белка: подвижная и малоподвижная. Первая форма стабильна при высокой температуре и высокой влажности, вторая — при низкой температуре и (или) низкой влажности. Переход происходит за счет разрыва слабых, стабилизирующих неподвижную форму связей и увеличения удельной энтропии подвижного состояния. Изменение энтропии ΔS зависит от содержания воды. Зависимость ΔS от влажности имеет место, например, если в подвижном состоянии образуется полость, которая содержит несколько (α) связанных молекул воды, а в неподвижном состоянии полость закрывается и молекулы воды вытесняются в окружающее пространство. Изменение энтропии, связанное с этим процессом, равно

$$\Delta S_{H_2O} = \alpha k \ln P/P_*. \quad (10)$$

Доля молекул в неподвижном состоянии (и фактор f') задается формулой (5), где

$$\Delta G = \Delta G_0 - \alpha kT \ln P/P_*, \quad (11)$$

ΔG_0 — изменение свободной энергии без учета эффектов влажности.

Пусть точка $P/P_* = P^*/P_*$ есть точка фазового перехода, т. е. в этой точке $\Delta G = 0$. Так как переход совершается в достаточно узком интервале значений влажности образца, то раскладывая в точке фазового перехода $\ln P/P_*$ в ряд по $\Delta P = P - P^*$ получим

$$f' \approx [1 + e^{\alpha \Delta P/P^*}]^{-1}. \quad (12)$$

Эта формула при $\alpha \approx 10$ удовлетворительно описывает зависимость фактора f' от влажности P/P_* .

В общем случае при изменении как влажности, так и температуры необходимо учитывать зависимость ΔG_0 от температуры, которая обусловлена термодинамическими характеристиками белка. При этом фазовый переход по температуре должен наблюдаться при более высоких температурах в случае низкой влажности. Фазовый переход по влажно-

сти должен наблюдаться при более высокой влажности в случае более низкой температуры. Эти выводы полностью согласуются со сделанными выше (на основе модели ограниченной диффузии) заключениями о поведении фактора f' при изменении и температуры и влажности. Отметим, что формулы (10), (11) могут быть применены к анализу зависимости $f'(P/P_0)$ и с точки микровязкости белка. В этом случае под ΔG и ΔS_{H_2O} должны пониматься свободная энергия и энтропия активации микровязкости.

В настоящее время нет возможности сделать однозначный выбор между двумя обсуждаемыми моделями. Вполне возможно, что в дальнейшем их можно будет рассматривать как два аспекта одной и той же физической теории конформационной подвижности белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берг А. И., Нокс П. П., Кононенко А. А., Фролов Е. Н., Хрымова Н. Н., Рубин А. Б., Лихтенштейн Г. И., Гольдманский В. И., Парак Ф., Бука М., Мёссбауэр Р. Мол. биол., 1979, т. 13, с. 81.
2. Берг А. И., Нокс П. П., Кононенко А. А., Фролов Е. Н., Успенская Н. Я., Хрымова И. Н., Рубин А. Б., Лихтенштейн Г. И., Хидег К., Мол. биол., 1979, т. 13, с. 469.
3. Шайтан К. В., Рубин А. Б., Мол. биол., 1980, т. 14, № 6, с. 1323.
4. Шайтан К. В., Рубин А. Б., Биофизика, 1980, т. 25, № 5, с. 796.
5. Chernavskii D. S., Frolov E. N., Goldanskii V. I., Kononenko A. A., Rubin A. B., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, p. 1000.
6. Френкель Я. И., Кинетическая теория жидкостей, М.: Наука, 1978, с. 487.
7. Singwi K. S., Sjölander A., Phys. Rev., 1960, v. 120, p. 1093.
8. Кулячков А. А., Шайтан К. В., Рубин А. Б., Чернавский Д. С., Биофизика, 1980, т. 25, № 6, с. 981.
9. Nikolaev G. M., Knox P. P., Kononenko A. A., Grishanova N. P., Rubin A. B., Biochim. Biophys. Acta, 1980, v. 590, p. 194.

Поступила в редакцию 24.VI.1980

MÖSSBAUER SPECTRUM, CONFORMATIONAL MOBILITY AND HUMIDITY OF PROTEINS

K. V. SHAITAN, A. B. RUBIN, D. S. CHERNAVSKY, A. A. KILYACHKOV

Biological Department, M. V. Lomonosov Moscow State University

Using theoretical models for restricted diffusion and segmental phase transition, the probability of the Mössbauer effect in relation to their humidity is considered. The dependence of protein microviscosity, η , on protein water content, c_{H_2O} is established. c_{H_2O} dependence of η (c_{H_2O}) can be interpreted in terms of the theory of concentrated solutions (suspensions) of macromolecules.