

УДК:577.150.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ДОМЕННОЙ СТРУКТУРЫ МАКРОМОЛЕКУЛ РАДИОИЗОТОПНЫМ МЕТОДОМ

ДЖАФАРОВ Э.С.

Институт Радиационных Проблем НАН Азербайджана

В работе с целью получения информации о внутримолекулярной упаковке молекулы сывороточного альбумина человека (САЧ) был применен метод тритиевой метки. Были получены большие пепсиновые фрагменты САЧ, содержащие интактные домены, и исследованы их доступные поверхности. Вычислены площади поверхности как самих фрагментов, так и спрятанных между ними участков, и на основе этого было определено число доменов молекулы.

Идея доменной структуры сывороточного альбумина (СА) широко обсуждается в литературе до сегодняшнего дня. При исследовании поляризации флюоресценции связанных красителей Вебер [1] обнаружил увеличение вращательной свободы флуоресцентных зондов при низких рН, и это позволило ему предположить, что составные части молекулы сывороточного альбумина при этом диссоциируют. Гаррингтон и др. [2], продолжая исследование Вебера, методом светорассеяния подтвердили наличие субъединиц в структуре белка. Это было первое сообщение о доменной структуре СА.

Идея доменной структуры СА была поддержана Фостером [3]. Его модель структуры альбумина основывалась на электрофоретическом поведении белка при низких рН и особенно при N-F-переходе. Согласно этой модели, молекула альбумина состоит из четырех глобулярных доменов, соединенных короткими, беспорядочно свернутыми полипептидными цепями. Эти глобулярные области образуют три интерфазы, причем Фостер предположил, что две из них обладают преимущественно гидрофобным характером.

Другой вариант доменной структуры молекулы СА принадлежит Блумфельду [4], который, используя гидродинамические данные и данные по рассеянию рентгеновских лучей под малыми углами, предложил модель из трех сфер с диаметрами 38, 53 и 38Å, соединенных в цепочку.

Наиболее полные сведения о доменной структуре СА были получены после того, как была определена его первичная структура. Определение полной аминокислотной последовательности альбумина и ее тщательный анализ дали основание Брауну [5] предложить трехмерную структуру этого белка. Согласно этой модели, СА состоит из трех цилиндрических доменов. Описанная модель, несмотря на схематичность, достаточно хорошо согласуется с экспериментальными данными, подтверждающими идею существования гидрофобных "щелей" и "карманов", локализованных в местах контакта доменов и субдоменов.

Учитывая уникальные особенности метода тритиевой метки, заключающиеся в возможности получения более прямой информации о доступной поверхности глобулы белка, мы молекулу расщепляли на большие N- и C-концевые фрагменты [6]. При этом исходили из того факта, что расщепление полипептидной цепи произойдет в тех междоменных гибких участках, и, в итоге, они окажутся доступными атомам трития.

Условия эксперимента

В работе использовали САЧ фирмы «Sigma»(Англия). Дважды кристаллизованный и лиофильно-высушенный пепсин также был получен из этой фирмы.

Большие фрагменты САЧ получали с применением пепсина (подробная методика получения фрагментов описана нами в работе [6]). Затем фрагменты, соответствующие аминокислотным остаткам 1-386 (FR₁), 308-584 (FR₂), 39-307 (FR₃), отделяли, концентрировали, и их водный раствор распыляли на предварительно охлажденную (до 77К) стенку реактора.

Тритиевую метку вводили, бомбардируя полученные мишени фрагментов термически активированными (2000 К) атомами трития [7].

Далее облученные и освобожденные от лабильного трития с помощью гель-фильтрации на колонках с сефадексом G-25 образцы фрагментов гидролизovali по стандартной методике (6N HCl, 105°C, 24 ч) до свободных аминокислот и анализировали смесь на аминокислотном анализаторе типа «LKB-Biochrom-4150» (Швеция).

Удельные радиоактивности каждого вида аминокислотного остатка фрагментов определяли одновременным сбором фракций элюата, вышедшего из анализатора.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования по распределению радиоактивной метки по аминокислотным остаткам в разных фрагментах САЧ представлены в таблицах 1,2,3 (колонки 2).

Применяя предложенный ранее нами [8] способ, определяли площади доступной поверхности для каждого фрагмента.

Определение площади доступной поверхности фрагмента FR₁.

Из линейной зависимости между удельной радиоактивностью и доступной площадью ($J=kS$) с учетом коэффициентов пропорциональности (k) вычисляли площади доступной поверхности каждого вида остатка (Таблица 1). Далее, учитывая число остатков в фрагменте, суммированием этих площадей определяли значение общей доступной площади, равное 6900Å^2 . При этом на долю гидрофильных остатков приходится 1600Å^2 , а гидрофобных — 5300Å^2 .

Понятно, что определенное таким образом значение доступной площади составляет только часть полной поверхности, так как при ее определении мы учитывали только площади углеродных атомов, образующих СН-связь, в которую может включаться тритиевая метка. Как и в случае нативного белка, часть поверхности, которая приходится на долю остальных атомов, определяли составлением простой пропорции.

Тогда

$$S_{\text{г/фильн.}} = 1600 + \frac{1600 \cdot 4100}{1300} = 6600\text{Å}^2, \quad S_{\text{г/фобн.}} = 5300 + \frac{5300 \cdot 270}{1000} = 6700\text{Å}^2.$$

При этом для площади полной доступной поверхности фрагмента FR₁ находим значение, равное $S_n = 6600 + 6700 = 13300\text{Å}^2$.

Определение площади доступной поверхности фрагментов FR₂ и FR₃. Из таблицы 2 для фрагмента FR₂ вычисляли значение общей доступной площади, равное 3400Å^2 (доли гидрофильных и гидрофобных составляли соответственно 800Å^2 и

2600Å²). Аналогичным образом определяли площади полной поверхности как гидрофильных, так и гидрофобных остатков:

Площадь полной поверхности фрагмента FR₂ будет равна

$$S_n = 3300 + 3300 = 6600\text{Å}^2.$$

Таким же способом из таблицы 3 вычисляем соответствующие значения для фрагмента FR₃, которые равны соответственно 4520Å² (1030Å², 3500Å²). Площади полной поверхности гидрофильных и гидрофобных остатков при этом равны будут

$$S_{\text{г/фильн.}} = 1030 + \frac{1030 \cdot 4100}{1300} = 4300\text{Å}^2, \quad S_{\text{г/фобн.}} = 3500 + \frac{3500 \cdot 270}{1000} = 4500\text{Å}^2,$$

а S_n при этом для FR₃ равна S_n = 4300 + 4500 = 8800Å².

Применяя способ определения общей доступной поверхности белковой глобулы по данным тритиевой метки [8], находим, что при этом общая доступная поверхность увеличивается от 39000Å² (для нативного) до 71000Å².

$$S_{\text{г/фильн.}} = 800 + \frac{800 \cdot 4100}{1300} = 3300\text{Å}^2, \quad S_{\text{г/фобн.}} = 2600 + \frac{2600 \cdot 270}{1000} = 3300\text{Å}^2.$$

Принимая во внимание мультидоменную природу пространственной организации молекул СА, можно оценить также величину поверхности, локализованной в интерфазах.

Таблица 1.

Значения удельных радиоактивностей и доступных площадей аминокислотных остатков фрагмента FR₁

Аминокислотные остатки	I±δ	κ	S _{выч.}	n	S _{выч. n}
Lys	1,2±0,3	0,12	10,0	33	330
His	2,1±0,9	0,16	13,1	11	140
Arg	2,5±0,7	0,10	25,0	15	370
Asx	0,2±0,1	0,10	2,0	35	70
Glx	0,3±0,2	0,20	1,5	50	70
Thr	1,5±0,5	0,10	15,0	14	200
Ser	0,4±0,1	0,10	4,0	15	60
Tyr	1,7±0,8	0,07	24,3	12	300
Gly	0,7±0,2	0,09	7,8	7	50
Pro	0,7±0,2	0,11	20,0	15	300
Ala	2,2±0,4	0,12	16,7	48	820
Val	2,0±0,8	0,11	28,2	24	680
Ile	3,1±1,1	0,10	63,0	6	380
Leu	6,3±2,0	0,08	58,8	43	2580
Phe	4,7±0,8	0,09	22,1	23	500
	1,9±0,7				

Примечание: I-удельные радиоактивности аминокислотных остатков,

n – число аминокислотных остатков фрагмента FR₁,

S_{выч.} - доступная поверхность аминокислотных остатков.

Таблица 2.

Значения удельных радиоактивностей и доступных площадей аминокислотных остатков фрагмента FR₂

Аминокислотные остатки	I±δ	к	S _{выч.}	N	S _{выч. n}
Lys	1,5±0,3	0,12	12,5	18	220
His	2,3±0,9	0,16	14,4	4	50
Arg	1,9±0,5	0,10	19,0	8	150
Asx	0,1±0,1	0,10	1,0	18	20
Glx	0,2±0,1	0,20	1,0	26	20
Thr	1,1±0,4	0,10	11,0	10	110
Ser	0,3±0,1	0,10	3,0	9	25
Tyr	1,2±0,7	0,07	17,1	10	170
Gly	0,8±0,2	0,09	8,9	4	35
Pro	2,5±0,5	0,11	22,7	10	230
Ala	2,0±0,7	0,12	16,7	13	220
Val	3,2±1,1	0,11	29,1	21	610
Ile	5,6±2,1	0,10	56,0	1	60
Leu	4,8±0,9	0,08	60,0	21	1260
Phe	2,0±0,6	0,09	22,2	9	200

Таблица 3.

Значения удельных радиоактивностей и доступных площадей аминокислотных остатков фрагмента FR₃

Аминокислотные остатки	I±δ	к	S _{выч.}	n	S _{выч. n}
Lys	1,0±0,2	0,12	8,3	25	210
His	2,1±0,9	0,16	13,1	8	105
Arg	2,1±0,7	0,10	21,0	13	270
Asx	0,1±0,1	0,10	1,0	28	30
Glx	0,3±0,1	0,20	1,5	36	50
Thr	1,2±0,4	0,10	12,0	11	130
Ser	0,4±0,1	0,10	4,0	12	50
Tyr	1,3±0,5	0,07	18,6	7	130
Gly	0,5±0,2	0,09	5,6	5	30
Pro	1,9±0,4	0,11	17,3	10	170
Ala	2,3±0,8	0,12	19,2	32	610
Val	2,8±1,0	0,11	25,5	12	310
Ile	5,7±1,8	0,10	57,0	4	230
Leu	5,1±0,9	0,08	63,8	29	1850
Phe	2,0±0,7	0,09	22,2	13	290

По данным Теллера [9] при образовании димера из двух сферических субъединиц 14% общей поверхности делается недоступной воде. Если предположить, что к этому димеру присоединяется еще один сферический домен, то "исчезнут" еще 14% поверхности. Таким же образом можно предположить, что если глобулы расщепить на три субъединицы, то при этом доступная поверхность по отношению к воде увеличится на ~28%. Отметим, что в этих расчетах мы принимаем во внимание трехдоменную структуру СА. Однако, существует и мнение, согласно которому СА

состоит из четырех глобулярных доменов, соединенных короткими, беспорядочно свернутыми полипептидными цепями. Поэтому, принимая во внимание четырехдоменную структуру, можно заключить, что при расщеплении белка на 4 субъединицы доступная поверхность, определяемая молекулой воды, увеличится еще на 14% (т. е. всего на 42%).

Исходя из таких соображений и определяя площади спрятанной поверхности, можно грубо оценить число составляющих доменов молекулы СА. При определении площади доступной поверхности нативной молекулы САЧ методом тритиевой метки мы заметили, что из-за трехкратной разницы радиусов атома трития и молекулы воды, доступная поверхность по отношению к тритию (39000\AA^2) в $\sim 1,6$ раза выше поверхности, определяемой молекулой воды (24000\AA^2). Отметим, что последнее было определено теоретически на основе данных метода рентгеноструктурного анализа. Поэтому, полученное нами методом тритиевой метки значение площади доступной поверхности для смеси фрагментов (71000\AA^2) по отношению к воде будет составлять $\sim 44000\text{\AA}^2$ ($71000\text{\AA}^2:1,6$) вместо 24000\AA^2 . Пренебрегая различиями в аминокислотной последовательности, мы можем оценить площади спрятанной поверхности молекулы как для трехдоменной, так и для четырехдоменной структуры САЧ, которые составляют соответственно 12000\AA^2 ($44000\text{\AA}^2:0,28$) и 19000\AA^2 ($44000\text{\AA}^2:0,42$). Вычитывая эти значения для площади нативной глобулы в случае трех доменов, получаем значение, равное 32000\AA^2 ($44000-12000$), а в случае четырех доменов это значение составляет 25000\AA^2 ($44000-19000$). Как видно, в отличие от первого, второе значение почти совпадает с тем значением (24000\AA^2), которое было определено теоретически на основе данных рентгеноструктурного анализа. Такое совпадение позволяет поддерживать идею четырехдоменной структуры СА, а не трехдоменной.

Следует отметить, что о структурной организации СА возникли и начали развиваться две идеи, одна из которых связана с именем Фостера, а другая — с именем Брауна. Фостер придерживался так называемой четырехдоменной теории, согласно которой молекула СА состоит из четырех глобулярных доменов. Следует отметить, что, изучая большие фрагменты белка, Петерс [10] и Кинг [11] также пришли к аналогичному выводу. Однако, после определения первичной структуры СА возникла идея, согласно которой молекула этого белка состоит из трех цилиндрических доменов. Несмотря на то, что обе идеи долгое время существовали параллельно, последние годы большинство ученых отдавали предпочтение трехдоменной структуре.

Как видно, наши результаты не согласуются с идеей о трехдоменной структуре. Кроме того, хотя приведенные нами данные недостаточно основательны для однозначного вывода о существовании доменов в молекуле САЧ, разница в величинах доступной поверхности по отношению к воде и к тритию свидетельствует о наличии в глобуле участков с различной плотностью внутримолекулярной упаковки. В более рыхлоупакованных участках аминокислотные остатки доступны атомам трития, но недоступны молекулам воды; для того, чтобы удовлетворить этому условию, расстояния между остатками должны быть не менее $1,0-1,5\text{\AA}$ и не более $3,0\text{\AA}$. Заметим, что при таких расстояниях стабильность структуры может обеспечиваться длинноразнодействующими гидрофобными взаимодействиями, что вполне согласуется с гидрофобным характером таких участков, тогда как более короткодействующие дисперсионные взаимодействия на таких расстояниях не реализуются.

1. Weber G. Polarization of the fluorescence of macromolecules. 2. Fluorescent conjugates of ovalbumin and bovine serum albumin. – Biochem. J., 1952, v. 51, p. 155-167.

2. Harrington W.F., Johnson P. and Ottewill R.H. Bovine serum albumin and its behavior in acid solution. - Biochem. J., 1956, v. 62, p. 569-582.

3. Foster J.F. Plasma albumin. In: "The Plasma Proteins" (Ed. Putnam F.W.), New-York, Academic Press, 1960, v. 1, p.179-239.
4. Bloomfield V. The structure of bovine serum albumin at low pH. - Biochemistry, 1966, v. 5, p.684-689.
5. Brown J.R. Serum albumin: amino acid sequence. - In: "Albumin structure, function and uses" (Ed. s Rosenoer V. et al.), Oxford, Pergamon Press, 1977, p.27-52.
6. Джафаров Э.С., Алиев Л.А. Протеолитическое расщепление сывороточного альбумина человека, меченного тритием. - Изв. АН Азерб., Серия биол. наук, 1996, № 1-6, с.127-131.
7. Джафаров Э.С., Алиев Л.А. Структура и конформационные особенности сывороточного альбумина. - Баку, Изд-во "Элм", 1990, 204 с.
8. Джафаров Э.С. Структурные переходы в сывороточном альбумине человека. - Диссертация канд. хим. наук, Москва, 1986, 125 с.
9. Teller D.C. Accessible area, packing volumes and interaction surfaces of globular proteins. - Nature, 1976, v. 260, p. 729-731.
10. Peters T., Jr. Serum albumin. - Adv. Clin. Chem., 1970, v.13, p.49-86.
11. King T.P. Limited pepsin digestion of bovine plasma albumin. - Arch. Biochem. Biophys., 1973, v. 156, p. 509-520.

MAKROMOLEKULARIN DOMEN QURULUŞUNUN RADİOİZOTOP METODU İLƏ TƏDQIQI

CƏFƏROV E.S.

İşdə insan zərdabı albumininin molekul daxili quruluşu haqqında məlumat almaq məqsədilə tritiumla nişanlama metodundan istifadə olunmuşdur. Bu məqsədlə albuminin intakt domenləri özündə saxlayan böyük pepsin fraqmentləri alınmış və onların səth sahələri tədqiq edilmişdir.

Həm fraqmentlərin, həm də onlar arasında «gizlənmiş» ərazilərin səth sahələri hesablanmış və bunun əsasında molekulun domenlərinin sayı müəyyənləşdirilmişdir.

STUDY OF DOMAIN STRUCTURE OF MACROMOLECULES BY THE RADIOIZOTOP'S METHOD

DZHAFAROV E.S.

For the purpose of obtaining information about intramolecule's field of human serum albumin (HSA) a tritium labeling method was adopted. By treatment of the native protein with pepsin were obtained large fragments containing intact domains and were investigated accessible surface of these separated fragments.

Were calculated area of fragment's surface and surface concealed in interphases between subunits of molecule. The numbers of HSA domains were determined.