УДК 578.088:547.963.4

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОМПЛЕКСОВ Cu (II)-БСА С ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТОМ НАТРИЯ МЕТОДАМИ ЭПР И ЯМР

Р. А. АСАТУРЯН, К. С. ЛУСАРАРЯН

Обнаружено перераспределение электронной плотности в структуре комплексов Cu (II)-БСА при взаимодействии с додецилсульфатом натрия. Детергент взаимодействует с БСА полярными головками мицеллы. Обсуждается связь между спектрами ЭПР и EXAFS этих комплексов при добавлении додецилсульфата натрия.

Նատրիումի դոդեցիլսուլֆատի հետ փոխազդեցության դեպքում Cu(II)-ՏՍԱ կոմպլեքսների կառուցվածքում հայտնաբերված է էլեկտրոնային խտության վերաբաշխումը ՏՍԱ-ի հետ դետերգենտը փոխազդում է միցելայի պոլյար գլխիկներով։ Քննարկված է Cu(II)-ՏՍԱ կոմպլեքսների էՊՌ և EXAFS սպեկտրների միջև եղած կապը՝ նատրիումի դոդեցիլսուլֆատի ազդեցության դեպքում։

Electron density redistribution is found in the structure of Cu (II)—BSA complexes at their interaction with sodium dodecyl sulphate. The detergent interacts with the BSA by micelle polar heads. The relation between the EPR and EXAFS spectra of these complexes at addition of sodium dodecyl sulphate is discussed.

Ключевые слова: метод EXAFS, g-тензор, поле лигандов, симметрия окружения.

Ранее нами [4, 5] изучалось взаимодействие Cu (II) с бычьим сывороточным альбумином (БСА) в широком диапазоне значений pH, что позволило выявить два типа связывающих центров. В одном из них (тип 1), имеющем в основном аксиальную симметрию окружения, центральный атом меди окружен двумя атомами азота Гис (9) и Гис (18) молекулы БСА и двумя атомами кислорода молекулы воды [2]. В другом центре (тип 2)—с ромбической симметрией окружения—он окружен четырьмя атомами азота: один из аммиинной группы аспарагиновой кислоты, два атома азота пептидных связей и четвертый—N (3) имидазольного кольца Гис (3). В работе [5] на основании результатов, полученных методом ЭПР, обсуждались возможные изменения спектров EXAFS в зависимости от pH.

Авторами работы [8] при исследовании взаимодействия между додецилсульфатом натрия (DDCNa) и БСА микродилатометрическим методом выявлены изменения объема последнего, вызванные конформационной перестройкой белка с последующей денатурацией. Однако структура связывающихся центров при этом взаимодействии не изучалась, что и явилось целью данной работы и связи с возможностью применения метода EXAFS к изучению изменений структуры этих центров при взаимодействии с DDCNa.

Материал и методика. Бычий сывороточный альбумин Олайнинского завода химреактивов использовался в лиофильно-высушенном виде. Соль $CuCl_2$—марки «чда»

Комплексы Cu (II)-БСА готовились по методике, описанной в работе Бреслоу [6]. Ионная сила составляла 0,16 М KCl; концентрация БСА—$0{,}32 \cdot 10^{-3}$ М (2%), концентрация Cu (II) — $1{,}28 \cdot 10^{-3}$ М. Значения pH измеряли на pH-метре типа pH-673 с ошибкой ±0,025, откалиброванном по стандартным буферным растворам. Требуемые значения pH получали добавлением малых количеств NaOH или 0,1 Н HCl в исходный раствор комплексов. Буферные растворы нами не использовались во избежание образования тройных комплексов Cu (II)-БСА-буфер [3].

Спектры ЭПР комплексов Cu (II)-БСА регистрировались на ЭПР спектрометре (9,0 гГц) фирмы «Varian-E-4» (США), при —190°С, мощности клистронного генератора 10 мватт и постоянной времени 0,25 сек.

Использовался додецилсульфат натрия марки «Serva» (ФРГ).

Спектры ЯМР DDCNa регистрировались в 99,8%-ном D_2O при 31±1°С на ЯМР спектрометре (60 мГц) типа «Т-60» фирмы «Varian». Концентрация DDCNa составляла 0,4 М. В качестве внешнего стандарта использовали ТМС (тетраметилсилан). Ионная сила составляла 0,16 М KCl в D_2O. Значение pD поддерживали равным 7.

Результаты и обсуждение. На рис. 1а представлены спектры ЭПР комплексов Cu (II)-БСА (тип 1) при pH 5,5 в зависимости от концентрации DDCNa. Спектры имеют в основном аксиальную симметрию окружения, которая изменяется незначительно при добавлении DDCNa. При 300 мМ DDCNa наблюдаются несущественные изменения в центре спектра и в области магнитного поля 320,0 мТ, выявляющие плохо разрешенную суперсверхтонкую структуру, ранее идентифицированную [5].

На рис. 1 б приведены спектры ЭПР комплексов Cu (II)-БСА (тип 2) при pH 9,0 и различных концентрациях DDCNa. Видно, что если при pH 5,5 на спектрах четко наблюдаются три компоненты СТС,

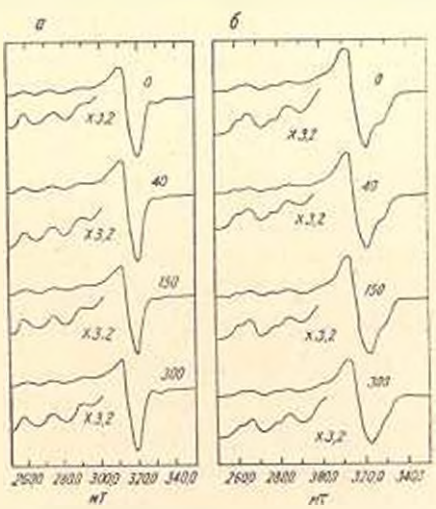

Рис. 1 а. Спектры ЭПР комплексов Cu(II)-БСА при —190°С и pH 5,5. Цифры справа указывают на концентрацию DDCNa в миллимолях. В левой части спектров проведена повторная запись части спектров при усилении в 3,2 раза большем, чем для основного спектра. б. Спектры ЭПР комплексов Cu(II)-БСА при —190°С и pH 9,0. Остальное то же.

то здесь можно выделить две основные с большой величиной расщепления, на которые наложены дополнительные компоненты от комплексов типа 1, в «чистом» виде видные при pH 5,5 (рис. 1 а).

Добавление DDCNa приводит к изменениям формы спектров в области $g_\parallel$. Так, уже при 40 мМ DDCNa уменьшается разрешение компоненты $g_\parallel$, а при 150 мМ и тем более 300 мМ наблюдается полное уменьшение ее разрешения. Такого типа изменения формы спектров при добавлении DDCNa могут быть результатом изменения симметрии окружения комплексов типа 2, вызванного структурной перестройкой БСА.

Эти изменения спектров ЭПР комплексов Cu(II)-БСА при добавлении DDCNa резко отличаются от изменений, вызванных щелочной денатурацией БСА [4].

На рис. 2а представлены значения констант СТС комплексов Cu(II)-БСА для каждого связывающегося центра. Значения констант СТС $A_{\parallel}$ для комплексов типа I при pH 5,5 при добавлении DDCNa изменяются в пределах 16,3—15,0 мТ таким образом, что даже 20 мМ DDCNa приводит к уменьшению $A_{\parallel}$ на 10 мТ. Добавление 80 мМ DDCNa не меняет значения $A_{\parallel}$ относительно 60 мМ, затем эта константа растет вплоть до 150 мМ, после чего наблюдается некоторый спад ее.

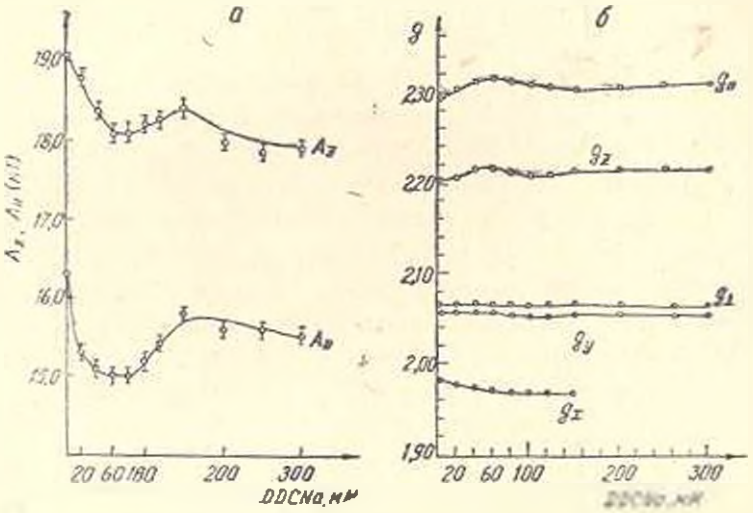

Рис. 2. а. Значения констант сверхтонкой структуры для комплексов Cu (II)-БСА при pH 5,5 ($A_{\parallel}$) и 9,0 (A_z) в зависимости от концентрации DDCNa. б. Значения g-тензоров для комплексов Cu (II)-БСА при pH 5,5 ($g_{\parallel}$ и $g_{\perp}$) и 9,0 (g_x, g_y и g_z) в зависимости от концентрации DDCNa.

Значения константы СТС $A_{\parallel}$ для комплексов типа 2 (pH 9,0) при 60 и 80 мМ DDCNa практически не изменяются. При 20 мМ DDCNa значение A_z уменьшается всего на 3,0 мТ. В дальнейшем значения константы СТС A_z растут медленнее, чем $A_{\parallel}$, вплоть до 150 мМ DDCNa, а затем также наблюдается уменьшение A_z при значениях DDCNa, выше 150 мМ.

Авторы работы [8] при добавлении DDCNa к БСА изменения объема последнего разделили условно на две стадии: первая—уменьшение объема БСА, когда концентрация DDCNa меняется в пределах 20—80 мМ, с минимумом при 80 мМ; вторая—увеличение объема, при концентрации DDCNa больше 80 мМ. Авторы при этом считают, что детергент взаимодействует с БСА, который претерпел структурные изменения. Наши данные по константам СТС подтверждают двухстадийность процесса взаимодействия между БСА и DDCNa, указывая на перераспределение электронной плотности в комплексах Cu(II)-БСА.

На рис. 2б даны значения g-тензоров для комплексов типа I ($g_{\parallel}$ и $g_{\perp}$) и типа 2 (g_x, g_y и g_z). Значения $g_{\parallel}$ при добавлении DDCNa растут вплоть до 80 мМ, падают, а затем претерпевают незначительные изменения. Величины $g_{\perp}$ практически не изменяются.

Большим изменениям $g_{\perp}$ соответствуют и большие изменения $A_{\perp}$ как для первой, так и для второй стадий этого взаимодействия. Меньшим изменениям $g_{\perp}$ соответствуют меньшие изменения $A_{\perp}$ для второго связывающегося центра. На рис. 1 б уменьшение разрешения компоненты g_x коррелирует с ростом для нее поля лигандов, показанным на рис. 2 б. Кроме того, с ростом концентрации DDCNa до 80 мМ и уменьшением поля лигандов для $g_{\parallel}$ и g_z происходит уменьшение констант СТС как для $A_{\perp}$, так и A_z. Дальнейшее увеличение концентрации DDCNa приводит к росту поля лигандов для $g_{\perp}$ и g_z и увеличению значений констант СТС как для $A_{\perp}$, так и A_z.

Таким образом, значения g-тензоров—$g_{\perp}$ и g_z, а также $A_{\perp}$ и A_z находятся в строгом соответствии друг с другом, указывая однозначно на изменения, которые происходят в структуре связывающихся центров на первой и второй стадиях взаимодействия между DDCNa и БСА.

На рис. 3 приведены спектры ЯМР 0,4 М DDCNa до и после добавления БСА. В контроле линию поглощения при 0,9 м. д. мы отнесли к гидрофобной CH_3 группе, при 1,3 м. д.—группе $(CH_2)_{10}$, а триплетный спектр при 4,0 м. д.—к CH_2 группе, взаимодействующей с соседней CH_2 группой и связанной с гидрофильной группой SO_4^-.

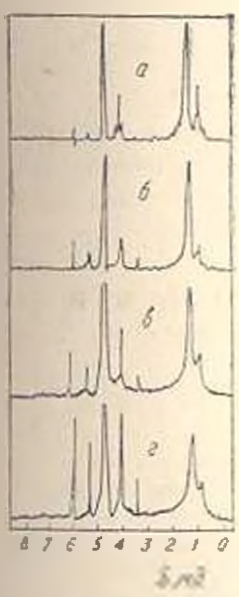

Рис. 3. Спектры ЯМР 0.4 М раствора DDCNa при 60 Мгц: а—контроль; б, в и г—то же, но добавлено 1.4, 3,5 и 4.7% БСА соответственно.

Добавление 1,4%-ного БСА приводит к превращению триплетного спектра в синглетный, а 3,5%-ного БСА смещает линию поглощения от CH_2 группы влево на 0,14 м. д. и уширяет ее в 6 раз. Присутствие 4,7%-ного БСА приводит к смещению этой линии влево на 0,24 м. д. и уширению в 7,5 раза по сравнению с таковым при 1,4%-ном БСА. Наблюдаемое уширение сигнала от группы $(CH_2)_{10}$ при добавлении БСА должно быть вызвано увеличением вязкости раствора, так как не имеет место его смещение.

Известно [1], что DDCNa при концентрации 0,4 М в растворе находится в виде мицеллы, гидрофильные головки которой обращены к ее наружной поверхности, а гидрофобная часть—к центру. Приведенные выше результаты, полученные методом ЯМР, свидетельствуют о том, что DDCNa взаимодействует с БСА полярными головками мицеллы.

Описанные выше (рис. 1 б) изменения спектров ЭПР, сопровождаемые уменьшением разрешения компоненты g_x и ростом поля лигандов для g_x (рис. 2 б) с увеличением концентрации DDCNa, указывают на переход симметрии этого типа комплексов (тип 2) от ромбической к аксиальной.

Применение EXAFS спектроскопии позволит получить структурные данные о таком изменении симметрии окружения: до добавления DDCNa радиальная функция распределения атомов в структуре этих

комплексов при низкой температуре должна, по-видимому, представлять двугорбую кривую из-за присутствия в координационной сфере четырех атомов азота, расположенных в узлах ромба. Добавление DDCNa в соответствии с нашими данными по ЭПР приводит к превращению этого ромба в квадрат, что должно, на наш взгляд, ухудшить разрешение предполагаемого расщепления радиальной функции EXAFS спектров этих комплексов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Адамсон А.* Физическая химия поверхности. М., 1979.
2. *Асатурян Р. А.* Биолог. ж. Армении, *36*, 570—575, 1983.
3. *Бреслоу Е.* В кн.: Неорганическая биохимия, вып. 1, 274—299. М., 1978.
4. *Asaturian R. A.* Preprint Yerevan Phys. Inst., 716 (31)—84.
5. *Asaturian R. A.* Preprint Yerevan Phys. Inst., 717 (32)—84.
6. *Breslow E.* Biol. Chem., *239*, 3252—3259, 1964.
7. *Doniach S., Eisenberger P., Hodgson K. O.* In: Synchrotron Radiation Research New York and London, 1980.
8. *Katz S., Shaw M. E., Chillag S. and Miller J. E.* J. Biol. Chem., *247*, 5228—5233, 1972.

Ереванский физический институт ГКИАЭ СССР,
Институт тонкой органической химии
АН Армянской ССР им. А. Л. Мнджояна

Поступило 18.XI 1985 г.

УДК 577.352.36

ИЗМЕНЕНИЕ НАПРАВЛЕНИЯ ТРАНСПОРТА H^+ В ЭРИТРОЦИТАХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ Ca^{2+}

А. В. ГЮЛЬХАНДАНЯН

Исследовано влияние Ca^{2+} и Mg^{2+} на индуцированные ионофором двухвалентных катионов A23187 потоки K^+ и H^+ в эритроцитах крысы. При наличии в среде инкубации 150 мМ NaCl и значениях внеклеточного Ca^{2+} от 0,01 до 1 мМ 3,3 мкМ ионофора вызывает сопряженный K^+—H^+ обмен через мембрану; при увеличении концентрации Ca^{2+} выше 1 мМ протинотранспорт K^+ и H^+ заменяется на одновременный выход этих ионов из клетки. При изменении мембранного потенциала в сторону положительных значений, так же как при снижении концентрации ионофора A23187, для обращения потока H^+ необходимо увеличивать количество добавленного Ca^{2+}. Ионы магния заметным образом снижают скорости как сопряженного K^+—H^+ обмена, так и одновременного выхода K^+ и H^+. Предполагается, что реверсия транспорта H^+ связана с увеличением потока Ca^{2+} внутрь эритроцитов.

Ուսումնասիրված է Ca^{2+}-ի և Mg^{2+}-ի ազդեցությունը երկվալենտ կատիոնների իոնոֆոր A23187-ով առաջացած K^+-ի և H^+-ի հոսքերի վրա առնետի էրիթրոցիտներում. Ինկուբացիոն միջավայրում 150մՄ NaCl և արտաբջջային Ca^{2+}-ի 0,01 մՄ մինչև 1մՄ արժեքների դեպքում, 3,3մկՄ իոնոֆորը առաջացնում է համատեղ K^+—H^+-ի փոխանակություն մեմբրանով, բայց Ca^{2+}-ի կոնցենտրացիան 1մՄ-ից բարձր է, K^+-ի և H^+-ի հակատրանսպորտը փոխարինվում է նույն իոնների միաժամանակյա դուրս մղումով բջջից։ Բջջի մեմբրանային պոտենցիալը փոփոխ-