АКУСТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Том 36 1990 Вып. 4

УДК 534.22:577.322.7

© 1990 г.

А. И. Приев, Г. В. Шильников

ИССЛЕДОВАНИЕ pH ЗАВИСИМОСТИ КОЭФФИЦИЕНТА ПОГЛОЩЕНИЯ И СКОРОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ УЛЬТРАЗВУКА В РАСТВОРАХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Проведено определение коэффициента поглощения и скорости распространения ультразвука в растворах иммуноглобулинов *G* в интервале pH от 2 до 12 на частоте 7,3 МГц. Показано, что вычисление релаксационного вклада в скорость ультразвука, рассчитанного из измерений коэффициента поглощения, позволяет проанализировать структурные и гидратационные перестройки в иммуноглобулинах *G* под влиянием pH среды.

В последнее время акустические методы все шире используются в изучении структурных, гидратационных и динамических характеристик белков. Первоначально акустические исследования растворов белков ограничивались в основном определением коэффициента поглощения ультразвука (α) и его частотной зависимости при различных условиях, например при разных pH среды [1—3]. Однако связь коэффициента поглощения с конформационной подвижностью белков и их гидратацией оказалась сложной и слабо выраженной [4, 5]. Кроме того, значительные вклады в поглощение реакций переноса протона между ионизируемыми группами белков и водой существенно затрудняют выявление этой взаимосвязи. С другой стороны, как показано в работах [6, 7] на примере исследования кислотной и щелочной денатурации миоглобина, другая акустическая характеристика — скорость распространения ультразвука — несет непосредственную информацию о характере структурных и гидратационных перестроек в белках.

Настоящая работа посвящена изучению конформационных перестроек и изменений гидратации в молекулах иммуноглобулинов *G* (IgG) под влиянием pH среды путем измерения коэффициента поглощения и скорости распространения ультразвука на одной фиксированной частоте.

В работе использовали IgG кролика, выделенные из сыворотки крови осаждением сульфатом аммония с последующей ионообменной хроматографией на ДЕАЕ целлюлозе («Whatman» Англия). Концентрацию IgG определяли спектрофотометрически по величине оптической плотности при 280 нм с погрешностью не выше 2%.

Коэффициент поглощения и скорость распространения ультразвука в растворах IgG определяли интерферометром постоянной длины РАДА-2, разработанным А. П. Сарвазяном и В. Н. Шестимировым [8]. Измерения проводили на частоте $f \simeq 7{,}3$ МГц в акустических ячейках объемом 0,8 см^3 с точностью относительного определения скорости распространения ультразвука 10^{-4}%, коэффициента поглощения 3%.

Исследования проводили в интервале pH от 2 до 12, при температуре 25° С и ионных силах 0,01 и 0,15 М (NaCl). pH растворов устанавливали добавлением необходимых количеств 1,89 М HCl или 1,36 М KOH при интенсивном перемешивании. Измерения pH проводили pH метром pH 121 непосредственно в акустической ячейке. Акустические параметры определяли чере 5 мин после введения титрующего вещества.

Зависимость коэффициента поглощения на длину волны ($\alpha\lambda$) от pH раствора при концентрации молекул IgG, равной 4,0 мг/см^3, приведена на на рис. 1 (кривая *1*). В интервале pH от 4,5 до 9, как видно из рисунка,

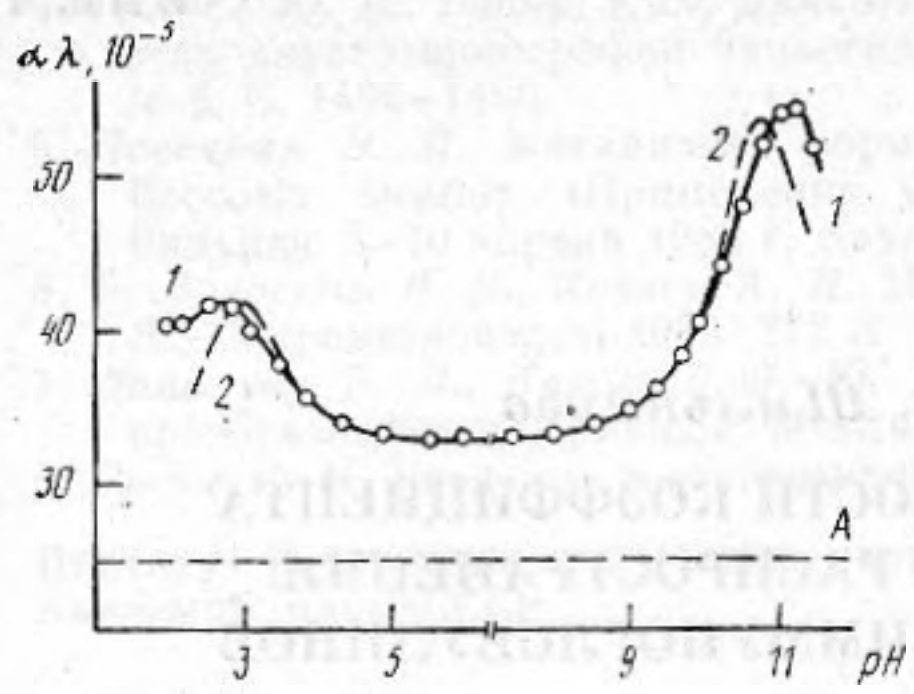

Рис. 1

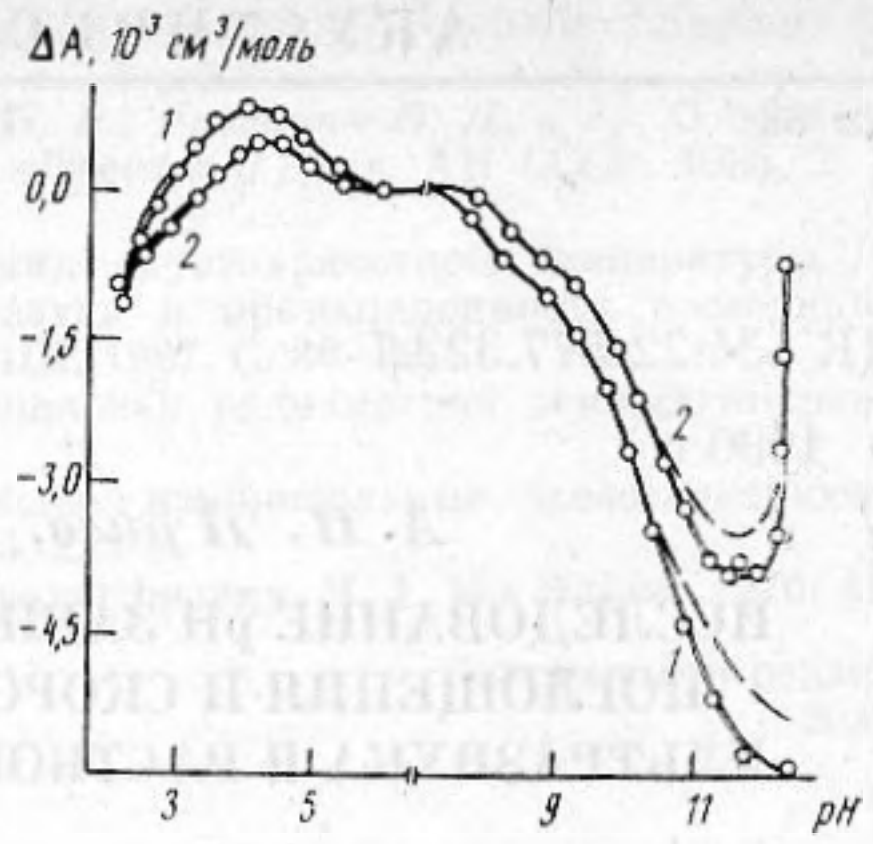

Рис. 2

Рис. 1. Зависимость коэффициента поглощения ультразвука на длину волны в растворе молекул IgG от pH среды: *1* – экспериментальная кривая, полученная при температуре 25° С и 0,15 М NaCl (C=4,0 мг/см³, молекулярная масса 150 000), *2* – теоретическая кривая, рассчитанная по формулам (4)–(7); *A* – растворитель

Рис. 2. Зависимость изменений инкремента скорости ультразвука молекул IgG от pH среды при 25° С: *1* – экспериментальная кривая, полученная при 0,01 М NaCl, *2* – экспериментальная кривая, полученная при 0,15 М NaCl. Пунктирной линией показаны значения ΔA после учета релаксационного вклада в скорость ультразвука: ($A=A-A_0$, где A_0A_0=31500 см³/моль соответствует нейтральным значениям pH среды

никаких существенных изменений коэффициента поглощения не наблюдалось. В кислой области при pH<4,5 и в щелочной при pH>9 появлялось дополнительное поглощение ультразвука с максимумами при pH 2,5 и 11,5. При этом величина избыточного поглощения при pH 11,5 приблизительно в 2,5 раза больше, чем при pH 2,5.

В нейтральной области pH удельное поглощение ультразвука ($\Delta\alpha/C$, где C – концентрация в г/см³) для молекул IgG составило по нашим данным 0,90±0,05 см²/г, в то время как в среднем для белков на частоте 7,3 МГц pH независимая составляющая удельного поглощения достигает 1,1±0,2 см²/г [4]. Эта составляющая, имеющая широкий релаксационный спектр, обусловлена преимущественно движениями самой полипептидной цепи, а также ее боковых аминокислотных групп.

Избыточное поглощение при кислых и щелочных pH, как отмечалось выше, связано с тем, что при распространении ультразвуковой волны происходит изменение объема системы, вызванное нарушением термодинамического равновесия реакций переноса протона между ионозируемыми карбоксильными или аминогруппами и водой:

$$R{-}COO^- + H_3O^+ \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} R{-}COOH + H_2O, \qquad (1)$$

$$R{-}NH_3^+ + OH^- \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} R{-}NH_2 + H_2O, \qquad (2)$$

где k_1 и k_{-1} – константы скорости прямой и обратной реакций соответственно.

Реакции типа (1) и (2) можно записать в общем виде

$$L + X \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} M, \qquad (3)$$

где X может быть либо ионом H_3O^-, либо OH^-. Релаксационные процессы, обусловленные реакцией (3), в первом приближении описываются уравнением для реакции с одним временем релаксации τ

$$(\alpha\lambda)_r = \frac{\pi(\Delta V)^2\Gamma}{\beta RT}\,\frac{\omega\tau}{1+(\omega\tau)^2}, \qquad (4)$$

Данные, используемые для расчета релаксационной составляющей коэффициента поглощения молекул IgG

Ионогенные группы и соединения	Количество групп, приходящихся на молекулу IgG [9]	pK	k_1, 10^{10} моль$^{-1}\cdot$с$^{-1}$ [3, 10]	ΔV, ΔA см$^3\cdot$моль$^{-1}$ [3, 10]
γ-карбоксильные группы глутаминовой кислоты	132	3,22	1	12, 8
β-карбоксильные группы аспарагиновой кислоты		3,62	1	12, 8
Фенольные гидроксильные группы тирозина	71	10,07	2	4, –
ε-аминогруппы лизина	54	10,53	2	25, 32
Гуанидиновые аргинина	48	12,48	2	25, 34
поли-*L*-лизин			0,7	24, –
Альбумин		10,60	0,7	26, –

где $(\alpha\lambda)_r$ – избыточное поглощение ультразвука на длину волны, $\omega=2\pi f$ – угловая частота, ΔV – адиабатический объемный эффект реакции, β – коэффициент адиабатической сжимаемости раствора, T – температура, R – универсальная газовая постоянная,

$$\Gamma=[(I/\bar{C}_L)+(I/\bar{C}_X)+(I/\bar{C}_M)]^{-1}, \quad (5)$$

где $\bar{C}_L$, $\bar{C}_X$ и $\bar{C}_M$ – равновесные концентрации компонентов.

Время релаксации в предположении, что коэффициенты активности равны единице, определяется следующим выражением:

$$\tau=[k_1(\bar{C}_L+\bar{C}_X+K^{-1})]^{-1}, \quad (6)$$

где $K=k_1/k_{-1}$.

Значения $pX(\equiv-\log\bar{C}_X)$, при которых избыточные поглощения в кислой и щелочной областях имеют максимумы, связаны с pK титруемых групп равенством [2]:

$$pX_{\max}=1/2(pK-\log(\bar{C}_L+\bar{C}_M)). \quad (7)$$

Формулы (4)–(7) позволяют, исходя из величин ΔV, k_1, pK и $C_0=\bar{C}_L+\bar{C}_M$ оценить величину избыточного поглощения при любом pH раствора. Литературные значения параметров, необходимых для расчета $(\alpha\lambda)_r$, представлены в таблице.

Расчет проводили в предположении, что максимум в кислой области обусловлен в основном взаимодействием протонов с концевыми и боковыми карбоксильными группами аспарагиновой и глутаминовой кислот, а максимум в щелочной области вызван титрованием ε-аминогрупп лизина, фенольных гидроксильных групп тирозина и гуанидиновых групп аргинина.

Теоретическая зависимость $(\alpha\lambda)_r$ изображена на рис. 1 пунктирной линией (кривая *2*). Характер поведения теоретической и экспериментальной кривых совпадает. Небольшой сдвиг максимумов теоретической кривой, возможно, отражает влияние ионной силы.

Как видно из экспериментальной кривой, величина $\alpha\lambda$ для IgG при pH<2 не возвращается к величине поглощения в нейтральной области pH. Этот факт, по-видимому, связан с тем, что при сильнокислых значениях pH проявляется конформационная релаксация разупорядочения внутримолекулярных связей в результате денатурации.

Основной характеристикой биополимеров, вычисляемой из измерений скорости распространения ультразвука в растворе, является концентрационный инкремент скорости распространения ультразвука A [1]: $A=(U-U_0)/(CU_0)$, где U и U_0 – скорость распространения ультразвука в растворе и растворителе соответственно, C – молярная концентрация. Величина A характеризует объемно-упругие свойства глобулы белка и его гидратной оболочки. Наличие в растворе релаксационных процессов приводит к появлению дополнительной релаксационной сжимаемости и соответственно к дополнительному вкладу в скорость распространения

ультразвука. Поэтому в общем случае величина A является суммой трех членов: гидратационного A_h, релаксационного A_r и члена, определяемого собственной сжимаемостью молекулы растворенного вещества A_m [11].

Относительные изменения величины A для молекул IgG в интервале pH от 2 до 12 при ионных силах 0,01 и 0,15 M (NaCl) приведены на рис. 2.

Для анализа структурных и гидратационных изменений по pH зависимости величины A необходимо оценить вклад в скорость распространения ультразвука всех релаксационных процессов, протекающих в растворе белка. Связь релаксационной составляющей скорости распространения ультразвука ΔU_r с частотой и временем релаксации задается выражением [12]:

$$\Delta U_r = \frac{(\alpha\lambda)_{\max} U}{\pi} \frac{1}{1+(\omega\tau)^2}, \tag{8}$$

где $(\alpha\lambda)_{\max} = (\alpha\lambda)_{\omega\tau=1}$.

Как показано в работе [13], при нейтральных значениях pH релаксационная составляющая скорости распространения ультразвука, рассчитанная с привлечением данных по частотной зависимости коэффициента поглощения ультразвука в растворах белков, не превышает 2%. На частоте 7,3 МГц величина ΔU_r будет еще меньше, и поэтому ею можно пренебречь.

При кислых и щелочных pH раствора появляются дополнительные вклады в ΔU_r, вызванные реакциями переноса протона. Предполагая для этих процессов одно время релаксации, можно из формул (4) и (8) получить выражение, связывающее экспериментально измеряемую величину $(\alpha\lambda)_r$ с A_r на одной фиксированной частоте

$$A_r = \frac{\Delta U_r}{CU} = \frac{(-\alpha\lambda)_r}{2\pi C} \frac{1}{\omega\tau}. \tag{9}$$

Значение A_r для IgG, рассчитанное по формуле (9), при pH 11,5 составило 880 см³/моль, а при pH 2,5—110 см³/моль. Таким образом, релаксационный вклад в щелочной области составляет 16%, а в кислотной — 4% наблюдаемого изменения величины A. После вычисления A_r экспериментальные кривые представлены на рис. 2 пунктирными линиями.

Известно, что в отсутствие структурных перестроек закисление приводит к плавному уменьшению величины A, соответствующему гидратационным эффектам реакции протонирования карбоксилов (ΔA ионизации карбоксильной группы 8 см³/моль). Однако на рис. 2 в интервале pH от 5,5 до 3 при 0,01 M NaCl наблюдается увеличение концентрационного инкремента скорости распространения ультразвука, достигающее 1050 см³/моль (A для молекулы IgG при pH 7 равен 31 500 см³/моль). Это свидетельствует о небольших конформационных изменениях в молекуле IgG, которые сопровождаются уменьшением собственной сжимаемости глобулы на 5—6%. При этом предполагалось, что для молекул IgG вклад собственной сжимаемости составляет приблизительно 65% величины A [14]. Данный факт согласуется с результатами работы [15], в которой показано, что при pH<5 происходит некоторая перестройка вторичной структуры в F_c-фрагментах, тогда как в F_{ab}-фрагментах молекул IgG существенных изменений пока еще не происходит.

Рассчитанное значение ΔA ионизации всех титруемых карбоксильных групп до pH 2 в предположении, что при этом все указанные группы полностью ионизированы, составило −1050 см³/моль, что по абсолютной величине почти в 2 раза меньше наблюдаемого изменения ΔA при 0,01 M NaCl. Дополнительное уменьшение величины A в кислой области, вероятно, связано со значительной агрегацией молекул IgG.

Анализ кривых титрования в щелочной области показал, что изменения концентрационного инкремента скорости ультразвука отражают два процесса, дающие противоположный вклад в величину A. Первый — гидратационные эффекты, вызванные ионизацией аминогрупп, второй — денатурационные изменения в молекуле IgG, приводящие к разворачиванию

полипептидной цепи молекулы и уменьшению ее сжимаемости. По кривой *1* можно заключить, что в щелочной области денатурационные изменения молекул IgG наступают при pH⩾11.

Сумма гидратационных вкладов всех титруемых аминокислот в щелочной области (ΔA ионизации аминогруппы $\simeq -32$ см³/моль) составила приблизительно -5550 см³/моль, что согласуется с экспериментальным значением $A=-5050$ см³/моль. Отклонение от аддитивности на 10% может быть связано с началом процесса разворачивания белковой > глобулы при pH>11.

Различный характер кривых *1* и *2* как в кислой, так и в щелочной областях отражает сильное влияние ионной силы на конформационное состояние молекул IgG и на доступность ионогенных групп. Поэтому можно предположить, что наблюдаемое развертывание полипептидной цепи IgG обусловлено силами электростатического отталкивания.

Авторы искренне признательны А. П. Сарвазяну и Д. П. Харакозу за ценные замечания при обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Zana R., Lang J.* Effect of pH on the ultrasonic absorption of aqueous solutions of proteins // J. Phys. Chem. 1970. V. 74. № 13. P. 2734–2736.
2. *Hussey M., Edmonds P. D.* Proton transfer reactions. A mechanism for the absorption of ultrasound in aqueous solutions of proteins // J. Phys. Chem. 1971. V. 75. № 26. P. 4012–4019.
3. *Zana R., Lang J., Tondre C., Sturm J.* Interactions of ultrasound with proteins and nucleic asids in solutions // Interaction of Ultrasound and Biological Tissues/Ed. by Reid J. M., Sikov M. R. DHEW (FDA). Wash. 1972. P. 21–26.
4. *Kremkau F. W., Cowgill R. W.* Biomolecular absorption of ultrasound: 2. Molecular structure // J. Acoust. Soc. Amer. 1985. V. 77. № 3. P. 1217–1221.
5. *Kremkau F. W.* Biomolecular absorption of ultrasound: 3. Solvent interactions // J. Acoust. Soc. Amer. 1988. V. 83. № 6. P. 2410–2415.
6. *Sarvazyan A. P., Kharakoz D. P., Hemmes P.* Ultrasonic investigation of the pH dependent solute-solvent interactions in aqueous solutions of amino asids and proteins // J. Phys. Chem. 1979. V. 83. № 13. P. 1796–1799.
7. *Хараков Д. П., Кършиков А.* Исследование структурных перестроек миоглобина при кислотной денатурации с помощью акустических измерений // Тез. докл. I Всесоюз. биофиз. съезда. М.: ОНТИ НЦБИ АН СССР. 1982. Т. 1. С. 29–30.
8. *Сарвазян А. П., Шестимиров В. Н.* Устройство для измерения скорости распространения и коэффициента поглощения ультразвука: А. с. 1205007 СССР // Опубл. в Б. И. 1986. № 2. С. 183.
9. *Иванов А. П., Короткоручко В. П., Нижинковская Т. Н.* Потенциометрическое исследование ионогенных групп иммуноглобулина *G*, характерного для злокачественного роста // Укр. биохим. журн. 1980. Т. 52. № 4. С. 501–504.
10. *Хараков Д. П.* Исследование сжимаемости белков и аминокислот в растворе акустическим методом: Дис. ... канд. биол. наук. Пущино: ИБФ АН СССР, 1983. 240 с.
11. *Сарвазян А. П.* Ультразвуковая велосимметрия биологических соединений // Новые физические методы в биологических исследованиях. М.: Наука, 1987. С. 183. 240 с.
12. *Стюэр Дж., Егер Э.* Распространение ультразвуковых волн в растворах электролитов // Физическая акустика. № 2. Ч. А/Под ред. Мезона У. Пер. с англ. М.: Мир, 1968. С. 371–485.
13. *Sarvazyan A. P., Hemmes P.* Relaxation contributions to protein compressibility from ultrasonic data // Biopolymers. 1979. V. 18. P. 3015–3024.
14. *Ивницкий Д. М., Приев А. И., Шильников Г. В.* Ультразвуковая велосимметрия растворов иммуноглобулинов // Акуст. журн. 1987. Т. 33. Вып. 4. С. 670–674.
15. *Малинина Е. А., Абатуров Л. В.* Взаимосвязь между статической структурой и различными уровнями внутримолекулярной подвижности в молекуле IgG // Тез. докл. I Всесоюз. биофиз. съезда. М.: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1982. Т. 1. С. 38.

Институт биологической физики
Академии наук СССР

Поступила в редакцию
12.12.88

A. I. Priev, G. V. Shil'nikov

AN INVESTIGATION OF A DEPENDENCE OF AN ABSORPTION COEFFICIENT AND A VELOCITY OF ULTRASOUND VERSUS PH IN SOLUTIONS OF IMMUNOGLOBULINES

An absorption coefficient and a velocity of ultrasound (7,3 MHz) were measured in solutions of IgG in dependence of pH varying in a range from 2 up to 12. A contribution of relaxation processes in IgG molecules to the ultrasound velocity in solutions was estimated by measuring the absorption coefficient of ultrasound. This allows to analyze structural and hydrational changes in Ig G due to variations of pH.