

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ РАСПАДА СТРУКТУР
И СТРУКТУРООБРАЗОВАНИЯ В БЕЛКАХ

*В. А. Каргин, П. В. Козлов, С. Я. Мирлина,
З. А. Капралова*

Многообразие жизненных процессов является результатом проявления различных химических и физико-химических свойств веществ, составляющих основу живых организмов, и их взаимодействия с веществами окружающей среды в направлениях, соответствующих специфике биологических явлений.

Для понимания последних приобретает большое значение также изучение структурных проблем, т. е. закономерностей образования и разру-

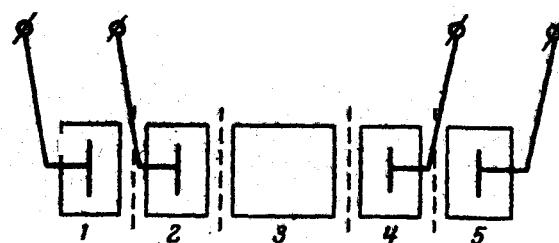


Рис. 1 Схема пятикамерного электродиализатора

шения структур в живых организмах, характеристика типов структур, их морфология и природа.

Поэтому представляло интерес изучить характер распада структур и последующий процесс структурообразования в белках, исследуя известное явление переноса белков через непористые мембранны при электродиализе.

Для этой цели был использован высоковольтный электродиализатор [1], схема которого представлена на рис. 1. Каждая камера диализатора отделена от соседней мембраной, в качестве которой в данной работе использовали целлофан. В среднюю камеру вводили диализуемый раствор или супензию, все остальные камеры заполняли бидистиллированной водой.

При наложении разности потенциалов до 2,5 кв к электродам 2 и 4 и до 0,3 кв к электродам 1 и 5 электродиализатора находящиеся в средней камере заряженные частицы переносятся в катодную или анодную камеры в зависимости от заряда ионов. При этом находящиеся в средней камере белки очищались прежде всего от присутствующих в них ионных примесей. Во время диализа проводили частую смену воды в ловушках (1 и 5) для предотвращения обратной диффузии. Растворы из катодной и анодной камер 2 и 4 в конце каждого дня сливалась и исследовались.

Преимущество данного диализатора по сравнению с трехкамерным состоит в том, что благодаря наличию двух дополнительных камер, играющих роль «электрических ловушек», динамическое равновесие в системе с очень малой долей дисперсного вещества постоянно смещается в сторону диссоциации исходных структур исследуемых белков на элементарные структурные единицы.

Объектами исследования в настоящей работе были фибрillлярные и глобулярные белки: желатина, миозин (в виде тонко измельченной мышечной ткани), яичный альбумин (в виде денатурированного белка куриного яйца) и эдестин.

Для исследования процессов структурообразования в белковых системах, диспергированных посредством электродиализа, применялся электронномикроскопический метод с использованием электронного микроскопа типа JEM-5Y при прямом электроннооптическом увеличении от $\times 15\,000$ до $\times 85\,000$.

Разрушение структур природных белков и их перенос через непористые мембранны при электродиализе. При изучении процессов электродиализа белков было замечено ранее [2], что некоторые из них со сравнительно высоким молекулярным весом обладают способностью проходить через непористые полимерные мембранны. Это явление имело место и в случае электродиализа исследованных нами белков в пятикамерном высоковольтном электродиализаторе. Глобулярные белки (едестин, денатурированный белок куриного яйца), а также один из фибрillлярных белков (миозин) переносились при температуре не выше 37° в боковые камеры через целлофановую мембрану в незначительных количествах, тогда как перенос желатины, осуществляемый в этих же условиях, составлял достаточно большие количества.

Отмеченное наблюдение заставило более подробно изучить это явление на примере желатины. Для этого исследовали влияние температуры на процессы переноса желатины при различных напряжениях на электродах электродиализатора (от 0,05 до 2,5 кВ). Оказалось, что повышение температуры содействует увеличению переноса желатины через мембрану. Многократными опытами удалось показать, что, используя температурный фактор, возможно достигнуть переноса желатины через мембрану в количествах до 30—40% от веса исходного продукта, находящегося в средней камере.

Естественно, возник вопрос о причинах такого явления. Перенос небольших количеств желатины при низких температурах обусловлен, по-видимому, присутствием в желатине низкомолекулярных фракций.

Для выяснения причин переноса больших количеств желатины при высоких температурах были поставлены специальные опыты по электродиализу 3%-ных растворов желатины с постепенным повышением температуры от 37 до 95° . Был исследован ход изменения вязкости диализуемых растворов желатины в средней камере при последовательном повышении температуры в ходе электродиализа. Результаты этих измерений приведены в таблице.

Как видно из таблицы, значительное падение вязкости начинается приблизительно при 80° . Вынесенное же количество желатины к этому времени составляло 30—40% от исходного количества белка, использованного для диализа. Из данных по вязкости были определены молекулярные веса: исходной желатины, равный 41,350, и желатины, оставшейся после диализа до 80° в средней камере, оказавшийся равным 30,870. Были измерены также вязкости растворов желатины, перенесенной при 60° и 80° через мембранны в боковые камеры, равные соответственно 1,760 и 1,680. Молекулярные веса этих продуктов составили — при $60^\circ \sim 23,590$, а при $80^\circ \sim 23,140$.

Таким образом, результаты измерений вязкости свидетельствуют об отсутствии существенной лестничной структуры в процессе электродиализа

даже при сравнительно высоких температурах (вплоть по 80°), тогда как перенесенные через мембрану количества белка составляли 40% от исходного.

Нами были поставлены также опыты по выяснению роли рН растворов желатины и влияния на процесс переноса изменения кислотно-щелочного равновесия. Для этого проводилось добавление серной кислоты по каплям при температуре 37° в среднюю камеру электродиализатора к диализуемому раствору после почти полного прекращения переноса белка при всех возможных напряжениях и температурах. Оказалось, что при многократном добавлении серной кислоты перенос белка не увеличивался.

Изменение относительной вязкости растворов желатины в зависимости от температуры в процессе электродиализа

Время от начала диализа, часы	Время диализа при данной температуре, часы	Температура в средней камере электродиализатора, $^{\circ}\text{C}$	Относительная вязкость раствора	Изменение относительной вязкости, %
0	0	—	2,880	—
10	10	37	2,870	0,4
20	10	40	2,860	0,7
30	10	45	2,830	1,7
40	10	55	2,790	3
50	10	60	2,780	3,5
55	5	65	2,678	7
60	5	70	2,546	12,6
75	15	80	2,140	25,7
85	10	85	1,610	44,1
97	12	95	1,590	44,8

Положение резко менялось, если в процессе электродиализа после почти полного прекращения переноса белка через мембрану вводить в среднюю камеру электродиализатора незначительные количества поверхностноактивных веществ. В качестве таковых были использованы как поверхностноактивные электролиты (дигексиловый эфир Na-соли сульфонянтарной кислоты), так и поверхностноактивные неэлектролиты (ОП-10).

При добавлении нескольких капель децимолярного раствора того или другого поверхностноактивного вещества перенос белков усиливался, что относится в одинаковой степени ко всем исследованным нами фибриллярным и глобуллярным белкам. Поверхностноактивные вещества добавляли в среднюю камеру электродиализатора при температуре $35-37^{\circ}$ по каплям до 0,5 мл. В случае высокотемпературного электродиализа температура перед добавлением поверхностноактивных веществ снижалась до 35° включением холодильников в 1, 2, 4, 5 камерах.

Проведение электродиализа желатины в растворах сильного диспергатора — мочевины трехмолярной концентрации — дало наибольший эффект. Перенос желатины в таком случае, что было проверено в специальной серии опытов, даже при пониженных температурах достигает в сравнительно короткое время 80% от исходного веса желатины, подвергавшейся электродиализу.

Это явление проливает свет на причины переноса белков через непористые мембранны и в то же время дает возможность создания более точных представлений о структуре белковых частиц. Еще Сведбергом [3] было обнаружено явление своеобразной неустойчивости, лабильности белковых частиц, подверженных в определенных условиях воздействию легко обратимых процессов ассоциации — диссоциации на отдельные

более мелкие частицы — блоки или основные молекулы. Основная белковая молекула — это наименьшая молекула, образующаяся при обратимой диссоциации белковой частицы. В основной молекуле все последовательные звенья связаны между собой ковалентными связями. Для многих белков основные молекулы [4] обладают молекулярным весом 17 000, и для многих родственных белков принцип кратности молекулярных весов, предложенный еще Сведбергом, имеет, по-видимому, весьма существенное значение. Способность многих белков к обратимой диссоциации на отдельные элементы, соединенные друг с другом в единую цепь связями, способными легко разрываться и вновь восстанавливаться в определенных условиях, указывает на относительную непрочность этих связей.

Такая структура белковых молекулярных образований хорошо согласуется с современными экспериментальными данными по изучению процесса распада белков и синтеза сложных структур из них методом изотопных индикаторов [5].

По-видимому, процесс переноса белков через непористые мембранны при электродиализе связан именно с этими особенностями сложного построения белковых молекул. В пятикамерном электродиализаторе происходит непрерывный распад белковых структур на отдельные небольшие по размерам и очень подвижные молекулы — блоки, которые легко переносятся через мембранны в боковые камеры с большой скоростью. Повышение температуры и приложенного напряжения облегчает процесс распада структур. Действие поверхностноактивных веществ и детергентов, очевидно, также сводится к лучшему диспергированию исходных белковых частиц.

Процессы структурообразования и характер структур белков, диффундирующих через непористые мембранны при электродиализе. Для изучения процессов возникновения белковых структурных образований из их элементов, прошедших непористую мембрану при электродиализе, было

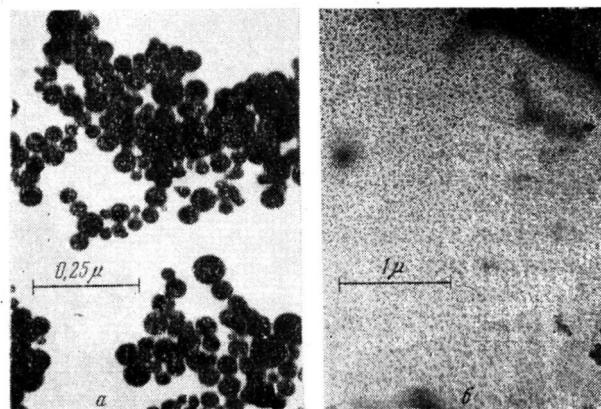


Рис. 2. Структурные образования в исходных белках: *a* — желатины; *б* — миозина

использовано прямое наблюдение образовавшихся структур в электронном микроскопе. Применение такого метода оказалось возможным при выполнении двух условий: высокой разрешающей способности электронного микроскопа и предупреждения возможности образования тонких пленок белка, которые не могут быть рассмотрены в электронном микроскопе, как не имеющие необходимого контраста для обнаружения структурных особенностей объекта. Величина разрешающей способности электронного микроскопа типа JEM-5Y, равная 8—10 Å, позволила выполнить первое условие. Выполнение второго условия было осуществлено исполь-

зованием растворов весьма малых концентраций (от 0,003% и менее) и их высушиванием при температурах выше точки застудневания. Для желатины высушивание раствора осуществлялось при 40°, при этом студня не образуется и можно наблюдать возникающие после высыхания раствора различные структурные образования белка. Для исходных фибриллярных белков — желатины и миозина — удалось наблюдать на электронномикроскопических снимках структурные образования глобулярного характера (рис. 2, а, б). Явление глобулизации желатиновых молекул в разбавленных растворах было известно и ранее [2]. В настоящем исследовании это явление еще раз подтверждилось прямыми электронномикроскопическими наблюдениями. При исследовании белков, прошедших через

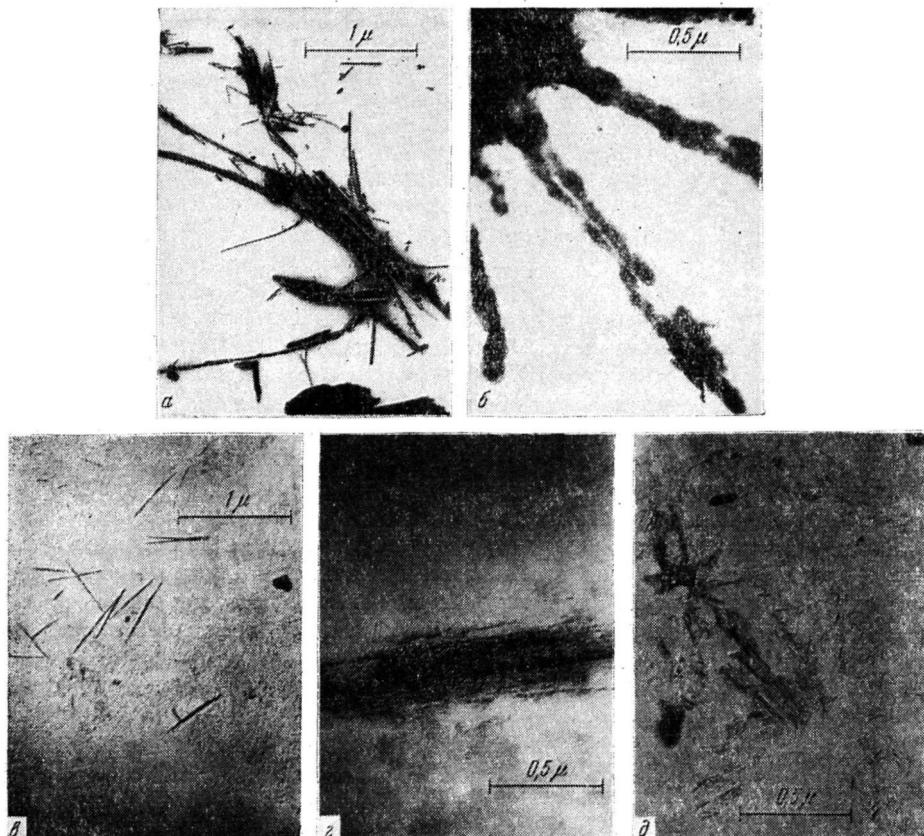


Рис. 3. Структурные фибриллярные образования белков, прошедших через мембрану: а, б — желатины; в, г — миозина; д — денатурированного яичного альбумина

мембрану, удалось наблюдать всю последовательность усложнения структурных образований, начиная от глобул и пачек цепей и кончая сочетанием пачек в фибриллы и фибрилл в более сложные структуры. Здесь были обнаружены правильные фибриллярные образования, резко отличающиеся от структур исходных белков, что по-видимому, связано с более быстрым процессом упорядочения мелких и подвижных структурных элементов, прошедших мембрану, в более сложные, но правильные структурные образования.

Из многочисленных электронномикроскопических снимков наиболее характерные приведены для желатины на рис. 3, а и б, для миозина на

рис. 3, в и г. На рис. 3, а хорошо различимы фибриллы желатины длиной от 1000 до 40 000 Å без деталей тонкой структуры их. Толщина фибрилл приблизительно одинакова. Были получены также фибриллы желатины, весьма похожие на фибриллы коллагена, с характерной для них ноперечной полосатостью вдоль оси фибрилл (рис. 3, б).

Наиболее последовательную и полную картину упорядочения структур удалось наблюдать для миозина. На рис. 3, в приводится характерная для миозина фибриллярная структура белка: у некоторых фибрилл удалось при достаточном увеличении выявить ясно выраженное дискретное строение (рис. 3, г).

Трудно оценить пока способ укладки отдельных цепочек в фибриллах, но на некоторых снимках видны частицы вытянутой спиралевидной формы, которые, располагаясь друг с другом, образуют длинные фибриллы прерывистого строения.

В случае денатурированного яичного альбумина, прошедшего мембрану, наблюдается аналогичная картина.

На рис. 3, д хорошо различимы сложные структурные образования, возникающие после переноса через мембрану указанного белка.

Таким образом, при электродиализе возможно диспергировать исходные белковые системы на мелкие структурные единицы, что является, по-видимому, необходимым условием последующего процесса структурообразования, приводящего к возникновению правильных фибриллярных образований.

В сильно диспергированных белковых системах, возникающих после электродиализа, образующиеся мелкие и подвижные структурные элементы белка вновь быстро сочетаются в разнообразнейшие формы простых и сложных структурных образований. Следует отметить, что независимо от фибриллярной или глобулярной природы того или иного белка синтез структур в зависимости от определенных условий опыта (концентрация, температура, введение поверхностноактивных веществ и дегтергентов) может приводить к возникновению и глобул, и фибрилл с последующим усложнением надмолекулярных структур. После диспергирования белков путем электродиализа удалось везде наблюдать, независимо от глобулярного или фибриллярного характера исходных белков, правильные прямолинейные образования, резко отличающиеся от исходных структур.

Выводы

В работе исследовались процессы разрушения структур белков и последующее структурообразование из элементов такого распада.

Для изучения процессов разрушения белковых структур был применен метод диспергирования с использованием явления переноса белков через полимерные мембранны при электродиализе. Было изучено влияние температуры, а также различных химических добавок (ионных и неионных поверхностноактивных веществ и дегтергентов) на перенос белков.

Повышение температуры и химические добавки в данном случае облегчают диспергирование системы, результатом чего является увеличение переноса белка.

При электронномикроскопическом исследовании процессов структурообразования удалось наблюдать в белках, прошедших через мембрану электродиализатора, новые высокоупорядоченные структурные образования.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. А. Ка́ргин, Т. А. Ма́твеева, Докл. АН СССР, 105, 294, 1955.
2. И. И. Жу́ков, Электрокинетические свойства капиллярных систем, Изд. АН СССР, 1956, стр. 296.; А. А. Таге́р, В. А. Ка́ргин, Ж. физ. хими, 15, 1029, 1941; П. И. Зубо́в, З. Н. Журкина, В. А. Ка́ргин, Докл. АН СССР, 67, 659, 1949.
3. Т. Svedberg, K. O. Pedersen, The Ultracentrifuge, Oxford, 1940; I. B. Eriksson—Quansel, T. Svedberg, Biol. Bull., 71, 498, 1936.
4. А. Г. Пасынский, А. В. Белицер, Успехи современной биохимии, 36, 236, 1953.
5. Г. М. Франк, В. А. Энгельгардт, Сборник философских проблем современного естествознания, Изд. АН СССР, 1959, стр. 316.

INVESTIGATION OF THE BREAKDOWN AND REBUILDING OF PROTEIN STRUCTURES

V. A. Kargin, P. V. Kozlov, S. Ya. Mirlina, Z. A. Kapralova

S u m m a r y

The breakdown of protein structures and their rebuilding from the resultant fragments have been investigated. The breakdown process was investigated by means of the dispersion method based on transfer of proteins through polymer membranes during electrodialysis. The effect of temperature and of various chemical additives (ionic and nonionic surfactants and detergents) upon the protein transfer was investigated. Elevation of temperature and of the amount of additives facilitates dispersion in the given case, increasing the transfer. Electron microscope investigation of the structuration process showed the formation of new, highly ordered structures in proteins that had passed through the membrane of the electrodialyzer.