

А. А. ТРАПЕЗНИКОВ

**УПРУГИЕ СВОЙСТВА МОНОСЛОЕВ БЕЛКОВ
(МИОЗИНА И МИОГЕНА) И ИХ ЗАВИСИМОСТЬ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ
В СВЯЗИ С ТЕПЛОЙ ДЕНАТУРАЦИЕЙ**

(Представлено академиком П. А. Ребиндером 19 VII 1948)

По аналогии с фазовыми превращениями высших алифатических соединений в двухмерном и трехмерном состояниях, исследованных при их равновесии в зависимости от температуры⁽¹⁾, было предположено, что и белки могут обнаружить изменения свойств при температурах „фазовых превращений“, например, при температуре денатурации объемного белка t_D : 1) в объемной фазе белка, но проявляться в изменениях двухмерного давления F монослоя как „равновесного“ индикатора, или 2) в самом монослое белка. Последнее ставит новый вопрос о возможности тепловой денатурации белка в монослое.

Термо-механические свойства монослоев белков, ранее не изучавшиеся, показывают, что для „гелеобразных“ монослоев характерны упругие свойства: модуль сдвига, величины упругих мгновенной и временной деформаций и лишь при длительных воздействиях и больших нагрузках необратимые пластично-вязкие или релаксационные деформации. Это сближает монослои белков, в особенности таких, как миозин, с объемными высокоэластичными веществами. Исследование этих свойств возможно „динамическими“ и „статическими“ методами.

Экспериментальная часть. Применялись методика и прибор, основанные на колебаниях и закручивании диска⁽²⁾. Монослои миозина наносились на поверхность 0,6 N КСl из осажденных в воде хлопьев (на воде монослои не образуются), монослои миогена А — из кристалликов на воду или 0,6 N КСl. Уже при малых $F \sim 1-3$ дин/см монослои ведут себя как упругие тела, уменьшающие период колебаний T крутильного маятника, что позволяет вычислить их «мгновенный» модуль упругости сдвига E_0 по формуле $E_0 = \pi M \left(\frac{1}{T^2} - \frac{1}{T_0^2} \right)$

$\left(\frac{1}{a^2} - \frac{1}{b^2} \right)$, где a — радиус диска (1,0 см); b — радиус сосуда (4,4 см); M — момент инерции маятника (122 г·см² при колебании в воде). По мере распространения монослоя и роста F (аналогично сжатию в ванне) изменяется как T , так и декремент затухания λ . По последнему можно вычислить „динамическую“ вязкость упругого монослоя $\eta_d = K p_d$, где $K = \frac{1}{4\pi} \left(\frac{1}{a^2} - \frac{1}{b^2} \right)$, существенно

отличающуюся от вязкости монослоев таких веществ, как, например, высшие спирты, или от вязкости упругого последствия или необратимой релаксации тех же монослоев. Величина $p_d = 2\lambda M / T$, где T — экспериментальный период, соответствующий λ , или η_d , характеризует потери энергии в упруго-вязком „эластичном“ теле при его быстрых де-

формациях. Она часто проходит через максимум с ростом F . Ее падение объясняется накоплением упругих связей в монослое, т. е. ростом сил взаимодействия между молекулами, а не снижением их, как это следует формально по уменьшению η . Значения T являются решающими при анализе данных, полученных маятниковым методом. В табл. 1 даны значения T , E , λ , ρ_d , η_d для монослоя миогена при его образовании. На рис. 1 показана зависимость F и E_0 от времени распространения τ монослоев миозина и миогена.

Таблица 1

τ , мин.	F дин/см	λ	$\eta = K \frac{2\lambda M}{T_0}$	T , сек.	E , дин/см	$\rho_d = \frac{2\lambda M}{T}$	$\eta_d = K \left(\rho_d - \rho_0 \right)$, пов. пуаз
0,00	0,00	0,039		$T_0 = 38,5$		$\rho_0 = 0,2471$	
0,75	3,64	1,364	0,642	31,7	0,113	10,51	0,709
2	5,03	2,57	1,208	25,4	0,316	24,69	1,845
5	6,35	3,08	1,447	20,92	0,58	35,92	2,691
6,5	6,59	2,39	1,124	18,67	0,794	31,26	2,341
25	8,62	1,744	0,820	11,20	2,63	38,03	2,851
78	8,90	1,35	0,635	9,4	3,86	35,02	2,621
140	9,98	1,036	0,487	7,866	5,62	32,1	2,401
190	10,60	0,883	0,415	7,12	6,91	30,25	2,261

Одним из „статических“ методов исследования упругих свойств монослоев является снятие кривых деформации во времени при постоянной нагрузке и после разгрузки (упругое последствие), а также вычисление E_0 по мгновенным деформациям S_0 . На рис. 2 показаны кривые для миозина при различных t . Значения E_0 , найденные по T и по S_0 , в общем совпадают. Это позволяет при измерениях $E_0 = f(t)$ ограничиться маятниковым методом, более точным.

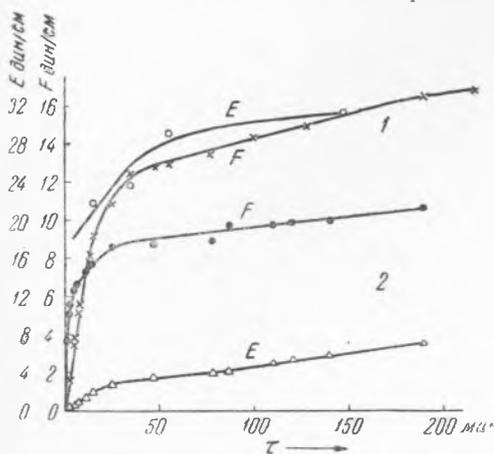


Рис. 1. 1 — миозин на 0,6 N KCl; 2 — миоген на воде

Кривые упругого последствия нагрузки подчиняются уравнению $S = S_0 (\tau/\tau_0)^{a_1}$, где a_1 — константа; S — полная деформация; S_0 — мгновенная деформация, относящаяся к $\tau_0 = 10-20$ сек., иногда до 50 сек.

(при высоких t); τ_0 — время начала нарастания S , состоящее из времени наложения нагрузки (6—10 сек.) и времени успокоения слабых колебаний маятника (λ падает с t) возле положения равновесия S_0 . Так как экспериментально $S_0 = P/E_0$, где $P = c_0 \varphi$ — нагрузка (φ — угол закручивания нити, c_0 — упругая постоянная нити, равная 3,255 дин·см/рад.), то $S = \frac{P}{E_0} \left(\frac{\tau}{\tau_0} \right)^{a_1}$. На протяжении $\tau = 1200$ сек. вся кривая в действительности состоит из двух частей, вторая описывается уравнением $S = S_{a_1} (\tau/\tau_{a_1})^{a_2}$, где S_{a_1} и τ_{a_1} — значения S и τ , соответствующие переходу кривой из первой части во вторую. Для различных t $a_1 = 0,18-0,09$, $a_2 = 0,20-0,15$, $\tau_{a_1} \approx 100-250$ сек. Наличие двух констант указывает на роль двух структурных элементов, последовательно участвующих в развитии временной деформации. Возможно в 1-й стадии

деформируется в основном сетка переплетенных боковых цепей, во 2-й — добавляется деформация главных полипептидных цепей.

Температурная зависимость. Измерения $S = f(\tau)$ проводились через 10 или 5°, T и λ — всегда через 5°, при постепенном нагревании одного и того же монослоя с задержкой на заданных t . Все измерение длилось 10—20 час. На рис. 3 показаны кривые

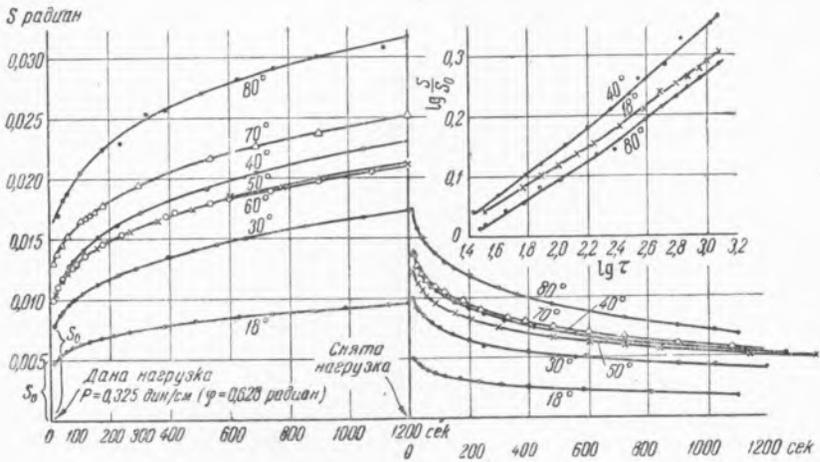


Рис. 2

$E_0 = f(t)$, вычисленные по T , для миозина и миогена (для двух различных препаратов из мускулов кролика), а также кривые для миогена при вторичном нагревании после охлаждения (на следующий день).

Все кривые характеризуются двумя особенностями:

1. Снижением E_0 в интервале от комнатной температуры t до t_d согласно эмпирическому уравнению гиперболического вида

$$E_0 = \beta \left(\frac{1}{T-273} - \frac{1}{T_d-273} \right) + ET_d, \text{ где } T - \text{ абсолютная температура,}$$

$T_d = 273 + t_d$. Эмпирическая константа 273°, возможно, связана с температурой затвердевания системы вода — белок.

2. Изменением хода кривой при $t_d \leq t_D$, связанным с денатурацией в монослое; t_d ниже t_D для миогена и равно для миозина. Кривая $E_0 = f(t)$ для миозина имеет площадку при 40—45°C, что эквивалентно повышению E_0 по сравнению с предыдущим ходом кривой; выше 65° возможно линейное снижение согласно уравнению $E_0 = E_m - \alpha T$. Для миогена при первом нагревании ход кривой изменяется при $t_d = 40^\circ$, E_0 растет до $t_D = 55^\circ$, далее не изменяется или слабо снижается. При вторичном нагревании сохраняется гиперболическая зависимость до 55°, затем E_0 падает линейно с t .

Рассматриваемые белки в объемном состоянии — в мышцах, нитях, в растворе, как известно, претерпевают тепловую денатурацию: миозин при 38—45°, миоген при 55° (3). В опытах автора 1% раствор миозина в 0,6 N KCl при нагревании до 39—40° застудневал в гель, затем при 45° белок отделялся от жидкости. По отношению к белку это соответствует возрастанию механических свойств, например, модуля упругости. Поэтому описанные опыты устанавливают тесную связь между изменением термических свойств белка в объемном состоянии и в монослое. Их естественно объяснить сходными изменениями структуры белка. При t_d возрастает не только E_0 , но и p_d (несмотря на снижение λ), а также приближенно вычисленная вязкость упругого последствия. Это, вероятно, связано с увеличением беспоряд-

ка в расположении молекул и отдельных цепей, повышением их переплетения вследствие разрывов (диссоциации) каких-то связей и ослабления внутренних напряжений в изогнутых молекулах, приводящего к изменению их конфигурации и повышению энтропии системы.

Переход белка в монослой не является аналогом тепловой денатурации объемного белка, как это часто считают, но особым видом денатурации. Оказывается, тепловая денатурация происходит независимо от растекания и в монослое в интервале $t_d - t_D$ (в значитель-

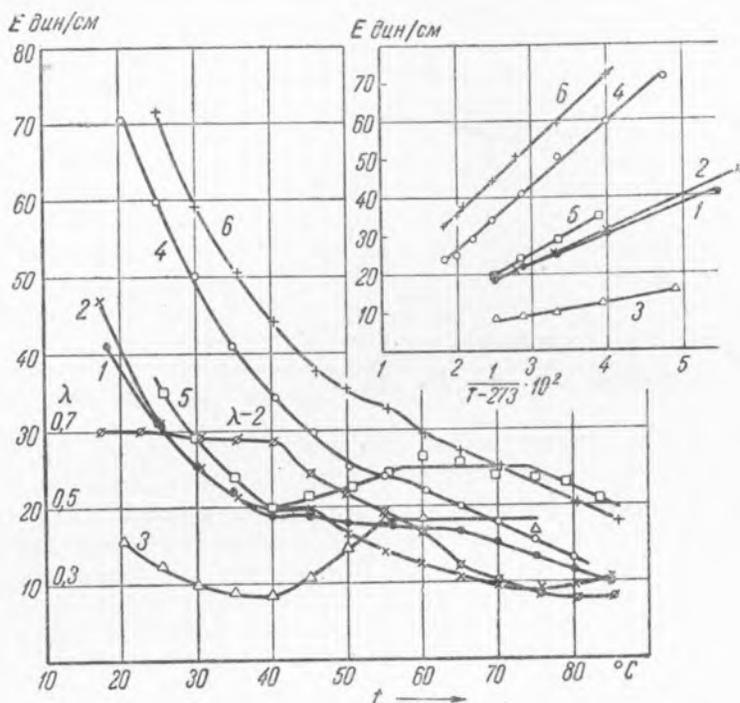


Рис. 3. Зависимость E_0 от (t) для монослоев белков: 1 и 2 — миозин на $0,6 N KCl$; 3 и 5 — миоген на воде при первом нагревании; 4 и 6 — при втором нагревании. $\lambda = f_i(t)$ для миозина к кривой 2.

ной мере обратимо) и заключается в дополнительном изменении структуры уже развернутой молекулы белка.

Изменение „равновесного“ F с температурой мало характерно.

Считая* толщину монослоя миозина 20 \AA , миогена 10 \AA , E_0 , при пересчете на 1 см толщины слоя при $t = 20^\circ$, составляет для миозина 200 кг/см^2 , для миогена $100-160 \text{ кг/см}^2$.

В заключение автор выражает благодарность члену-корреспонденту АН СССР В. А. Энгельгардту за любезное предоставление очищенных препаратов белков и за ценные дискуссии. Автор благодарит также Л. К. Серебряникову за помощь при выполнении измерений.

Институт физической химии
Академии наук СССР

Поступило
8 VII 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Трапезников, ДАН, 47, 227, 349 (1945); ЖФХ, 20, 61 (1946). ² I. Langmuir, Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol., 6, 177 (1938). ³ А. А. Трапезников, ЖФХ, 19, 228 (1945); 12, 583 (1938); А. А. Трапезников, Совец. по вяз. жидк. и коллоидн. растворов, 1, 67, 87 (1941). ⁴ А. Е. Mirsky, Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol., 6, 150 (1938).

* По измерениям давление — площадь М. М. Заалишвили в лаборатории В. А. Энгельгардта