

Г. А. ДЕБОРИН

О МОРФОЛОГИИ БЕЛКОВЫХ МАКРОМОЛЕКУЛ В ПОВЕРХНОСТНОМ СЛОЕ

(Представлено академиком А. И. Опариным 14 VI 1949)

Изучение мономолекулярных пленок белков в течение нескольких десятков лет привлекает к себе внимание исследователей. В последнее время наибольшее внимание уделяется изучению монослоев белков и ферментов в области малых давлений, так называемых «газовых» пленок. К «газовым» пленкам можно с хорошим приближением прилагать газовые законы, что позволило определить молекулярные веса для ряда белков и ферментов. Буллом, в частности, показано ⁽¹⁾, что для описания поведения двухмерных газовых пленок пригодно уравнение, формально аналогичное уравнению ван-дер-Ваальса для реальных газов:

$$\left(F + \frac{a}{A^2}\right)(A - b) = RT, \quad (1)$$

где F — поверхностное давление в динах на см; a — постоянная, учитывающая силы притяжения между молекулами; b — постоянная, пропорциональная площади, занятой газовыми молекулами; R — газовая постоянная; A — площадь пленки и T — абсолютная температура. При поверхностных концентрациях белка, дающих давления, не превосходящие 0,1—0,3 дин/см, силы взаимодействия между молекулами в поверхностном слое настолько малы, что ими можно пренебречь. Тогда уравнение (1) принимает вид:

$$FA = \alpha F + \beta. \quad (2)$$

Это уравнение графически изображается прямой линией. При нулевом давлении β , очевидно, равно предельному значению FA при условиях, когда справедлив идеальный газовый закон. Это позволяет легко вычислить, с одной стороны, молекулярный вес белка в поверхностном слое по значению β и, с другой, площадь, занимаемую молекулами в разбавленном монослое, когда между ними отсутствует взаимодействие. Исходя из этих соображений, Булл ⁽²⁾ экспериментально определил молекулярные веса яичного альбумина, β -лактоглобулина, пепсина и инсулина и показал хорошее совпадение полученных значений с данными Сведберга, установив тем самым справедливость примененного им уравнения (2).

Вместе с тем, при изучении монослоев белков был установлен ряд фактов, которые до сих пор не нашли своего полного объяснения. Совершенно неясен, в частности, основной вопрос, какие структурные превращения испытывает нативная белковая молекула в процессе образования поверхностного слоя. Между тем очевидно, что при образовании поверхностных слоев с молекулами белка происходят глубокие, часто необратимые, структурные изменения. Эти изменения проявляются в появлении у белка поверхностно-активных свойств, потере растворимо-

сти, гидрофобизации твердых гидрофильных поверхностей при адсорбции на них белков (3) и др. Вместе с тем несомненно, что глубокие изменения структуры белковых молекул в поверхностном слое не приводят к их полной денатурации, о чем свидетельствует сохранение ферментативной активности в поверхностном слое (4). Согласно рентгеновским и оптическим данным (5), толщина белкового монослоя, как правило, равна около 10 Å, тогда как, по измерениям Сведберга, радиус молекулы того же глобулярного белка (яичного альбумина) в растворе равен 22,5 Å. Все это свидетельствует о коренных морфологических изменениях белковой макромолекулы, происходящих под влиянием поверхностных сил, действующих на белковую молекулу на границе раздела фаз. Особенно сложны эти явления в случае так называемых конденсированных пленок.

Ныне общепринята точка зрения, что на поверхности раздела фаз белковая макромолекула разворачивается, образуя отдельные вытянутые полипептидные цепи или давая двухмерно-плоскую фигуру (3), причем в обоих случаях гидрофильные группы ориентированы к полярной фазе, а гидрофобные к неполярной фазе. Однако более детально вопрос о морфологии белковых макромолекул в поверхностном слое не исследовался. Между тем, как установлено Б. А. Талмудом с сотрудниками (6) и В. Г. Яковлевым (7), биологическая активность белков тесно связана с морфологией белковых макромолекул. Исходя из этих представлений, П. В. Афанасьеву (8) удалось показать влияние энергетики поверхностных изменений белковой макромолекулы на процессы ферментативного гидролиза и синтеза. Изучение морфологии белковых макромолекул в поверхностном слое и ее изменения под влиянием различных факторов представляют в этой связи большой биохимический интерес.

В основу наших представлений о морфологии белковых макромолекул в газовом монослое мы положили гипотезу Д. Л. Талмуда и С. Е. Бреслера (9) о структуре глобулярных белков, согласно которой истинная конфигурация реальной белковой макромолекулы в растворе представляет собою фигуру равновесия сил сцепления и отталкивания. Как показал С. Е. Бреслер (10), силы сцепления, глобулирующие белок, складываются из сил ван-дер-ваальсового притяжения гидрофобных боковых цепей друг к другу и сил водородных связей, действующих между пептидными группами соседних витков спирали, а силы, растягивающие глобулу, обязаны электростатическому отталкиванию между ионизированными гидрофильными боковыми цепями. Эти представления Бреслера и Талмуда нашли свое обоснование в ряде работ этих авторов (6, 10, 11), изучивших структурные превращения белковых макромолекул под влиянием различных глобулирующих и деглобулирующих факторов.

Исходя из представлений Талмуда и Бреслера о структуре глобулярных белков и в согласии с указанными экспериментальными фактами, мы полагаем, что в поверхностном слое белка происходит сложный процесс перестройки белковой макромолекулы, приводящий не к полному разворачиванию полипептидной цепи, а к образованию плоской спирали — так называемой «поверхностной глобулы». При такой перестройке цепь главных валентностей белковой макромолекулы уложена в поверхности в виде спирали, причем такая «поверхностная глобула» находится в динамическом равновесии, обусловливаемом, как и в случае объемной глобулы, равновесием сил сцепления и отталкивания. При этом полярные группы молекулы направлены в сторону «подкладки», а неполярные, углеводородные боковые цепи направлены вверх. Толщина такого слоя должна быть равна 10 Å, что соответствует как рентгеновским данным, так и результатам измерений толщины монослоев. Естественно, что в случае «поверхностной глобулы» ван-дер-ваальсовы силы взаимодействия углеводородных боковых цепей будут значительно более слабыми, чем в случае объемной глобулы, так как здесь не происходит

образования замкнутой углеводородной капли. Между пептидными группами соседних витков спирали будут действовать те же силы водородной связи, что и в случае объемной глобулы. Электростатические силы отталкивания между ионизированными гидрофильными боковыми цепями будут иметь здесь такое же значение, как и в случае объемной глобулы. В результате равновесия этих трех сил поверхностная глобула будет представлять определенную двухмерную фигуру равновесия, которую, однако, вследствие меньшей величины ван-дер-ваальсовых сил сцепления легче подвергнуть деформации, чем глобулу в объеме. В изоэлектрической точке такая поверхностная глобула должна быть, естественно, наиболее симметричной.

Сравним площади, которые занимают молекулы ряда белков в поверхностном мономолекулярном слое, с площадями, которые они занимали бы в нем, если бы белковые глобулы подвергались на поверхности «расплющиванию» без изменения объема, полагая, что толщина монослоя равна 10 Å (табл. I).

Таблица I

Белок	Объем молекулы по данным Нейрата ⁽¹²⁾ в Å ³	Поверхность, занимаемая «расплющенной» глобулой, в Å ²	Поверхность, занимаемая молекулами по эксперим. данным, в Å ²
Яичный альбумин	39 000	3900	6140 ⁽²⁾
Инсулин	41 300	4130	7900 ⁽²⁾
Пепсин	34 000	3400	3749 ⁽¹³⁾
β-лактоглобулин	40 300	4030	4800—5800 ⁽²⁾
Гемоглобин (лошади)	67 600	6760	13 094 ⁽¹³⁾

Из данных табл. I видно, что площади, занимаемые молекулами белков в газовом монослое, больше, чем рассчитанные нами в предположении об образовании симметричных плоских фигур. Это становится понятным, если учесть, что реальная молекула белка в поверхностном слое подвергается деформации под влиянием деглобулирующих сил, вследствие чего измеряемая кинетическая поверхность, занимаемая молекулами, должна быть больше статической поверхности.

Рассчитаем для молекулы яичного альбумина длину спирали поверхностной глобулы из экспериментальных данных. Согласно данным Булла⁽²⁾, молекула яичного альбумина занимает в газовом монослое поверхность 6140 Å². Радиус поверхностной глобулы равен при этом 44,2 Å. По рентгеновским данным⁽¹⁴⁾, ширина цепи главных валентностей в молекуле белка составляет 4,5 Å. Следовательно, поверхностная спираль типа эвольвенты окружности с плотно прилегающими друг к другу витками будет содержать десять витков. Мы рассчитали приближенно длину такой спирали и получили значение 1404 Å. Длина же полипептидной цепи яичного альбумина, состоящего из 384 аминокислотных остатков при длине каждого аминокислотного остатка в 3,5 Å⁽¹⁵⁾, составляет $384 \times 3,5 = 1344$ Å. Это совпадение свидетельствует, как нам кажется, в пользу развиваемых нами представлений.

Мы поставили перед собой задачу попытаться определить экспериментально значения площадей, занимаемых отдельными молекулами яичного альбумина в разбавленном мономолекулярном слое на насыщенном сернокислом аммонии при различных значениях рН, так как, согласно развитым нами выше представлениям, форма белковой молекулы в монослое должна существенно зависеть от количества электрических зарядов на ионогенных группах белка, что в свою очередь зависит от рН «подкладки».

Экспериментальная часть. Для опытов применялся кристаллический яичный альбумин в виде его 0,03% водного раствора.

Раствор сернокислого аммония доводился до необходимого значения рН прибавлением аммиака или серной кислоты. рН измерялось ламповым потенциометром с точностью до $\pm 0,05$. Поверхностное давление измерялось с помощью «весов» Вильгельми с крутильной нитью и оптическим отсчетом с точностью до 0,02 дин. Кривая давление —

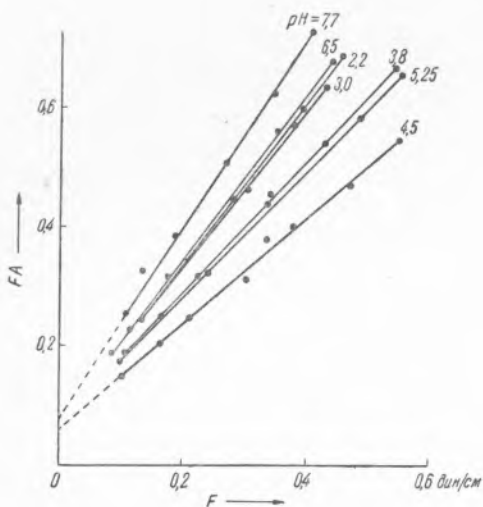


Рис. 1

площадь снималась в течение 2 час. при давлениях, не превышающих 1 дин. На рис. 1 приведены кривые зависимости произведения FA и F для яичного альбумина на насыщенный сернокислым аммоний при значениях рН, равных 7,7; 6,5; 5,25; 4,5; 3,8; 3,0 и 2,2. Площадь, приходящаяся на одну молекулу яичного альбумина в монослое, можно определить из угла наклона кривых α . Таким образом, можно определить площади, приходящиеся на одну молекулу белка при различных значениях рН (рис. 2).

Из этих данных следует, что в газовом монослое молекулы яичного альбумина занимают наименьшую площадь тогда, когда белок находится в изоэлектрической точке. По обе стороны от изоэлектрической точки происходит зарядка ионогенных групп белка, а электростатическое отталкивание между зарядами в гидрофильных боковых цепях приводит к растягиванию молекулы по поверхности раствора и, следовательно, к увеличению занимаемой ею кинетической площади. В щелочной области эффект этот выражен более сильно, что находится в согласии с тем, что в большинстве белков количество кислых групп в боковых цепях больше количества щелочных групп.

Точка пересечения прямых FA (F), позволяющая вычислить молекулярный вес белка в поверхностном слое с точностью до 10 ÷ 15%, совпадает с данными Булла. Отклонения находятся в пределах ошибок измерений, произведенных при данной методике. Можно ожидать, что в монослоях удастся осуществить процессы, аналогичные тем, которые вызывают в объеме мочевины, детергенты и др.

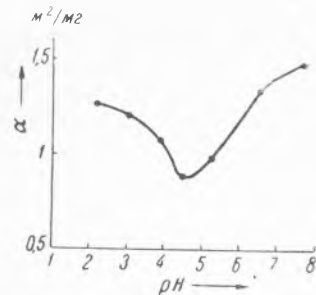


Рис. 2

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
13 VI 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. В. Булл, Adv. prot. Chem., 3, 95 (1947). ² Н. В. Булл, Journ. Am. Chem. Soc., 67, 4 (1945); 68, 742 (1946); 71, 450 (1949). ³ В. А. Пчелин, Совещание по белку, Сборн. докладов, М., 1945. ⁴ E. Gorter, Proc. Roy. Soc., 155, 706 (1936); Ann. Rev. Biochem., 10, 19 (1941). ⁵ W. T. Astbury, F. O. Bell, E. Gorter and J. van Ormondt, Nature, 142, 33 (1938). ⁶ П. В. Афанасьев, Б. А. Талмуд и Д. Л. Талмуд, ДАН, 55, 725 (1947). ⁷ В. Г. Яковлев, ДАН, 60, 89 (1948). ⁸ П. В. Афанасьев, ДАН, 63, 61 (1948). ⁹ С. Е. Бреслер и Д. Л. Талмуд, ДАН, 43, 326 (1944); 43, 367 (1944). ¹⁰ С. Е. Бреслер, Биохимия, 14, 180 (1949). ¹¹ П. В. Афанасьев, Б. А. Талмуд и Д. Л. Талмуд, ДАН, 55, 615 (1947). ¹² H. Neurath, Journ. Am. Chem. Soc., 61, 1841 (1939). ¹³ I. Langmuir and W. Schaefer, Chem. Rev., 24, 181 (1939). ¹⁴ J. Fankuchen, Adv. prot. Chem., 2, 387 (1945). ¹⁵ R. Corey, ibid., 4, 1385 (1948).