

В. А. БЕЛИЦЕР и А. С. ЦЫПЕРОВИЧ

СКАЧКООБРАЗНОСТЬ ДЕНАТУРАЦИОННОГО ПРЕВРАЩЕНИЯ БЕЛКОВОЙ МОЛЕКУЛЫ

(Представлено академиком А. В. Палладиным 7 I 1952)

При денатурации белка обычно происходит существенное уменьшение его растворимости, увеличение асимметрии его частиц, потеря специфических свойств и т. д. Все это свидетельствует о коренном преобразовании структуры молекул белка, о перестройке той системы внутримолекулярных связей, которая создает определенную укладку полипептидных цепей и других структурных элементов.

В зависимости от условий среды и особенностей белка то один, то другой признак денатурации может отсутствовать. Так, при специальных условиях денатурация не приводит к изменению степени асимметрии белковых частиц. Однако, если по тем или иным причинам выпадает один из обычных признаков денатурации, то остальные показатели в совокупности позволяют распознать денатурацию как глубокое и достаточно характерное изменение белка.

Новое подтверждение единства денатурационных процессов получено в Институте биохимии АН УССР иммунохимическим методом. Показано, что при денатурации яичного альбумина такими разнообразными агентами, как тепло, спирт, салицилат, роданид и ионы меди, получают препараты белка, по антигенной специфичности резко отличные от нативного альбумина, но весьма близкие между собой (1).

Изменчивость внешних показателей денатурации становится понятной, если учесть, что каждый белок существует во множестве различных состояний. Без коренной внутренней перестройки, характерной для денатурации, белок способен, например, образовывать комплексы с различными веществами, агрегироваться, осаждаться, переходить из одной ионной формы в другую, связывать растворители, изменять степень гидратации; часть реактивных групп белковой молекулы может быть химически изменена при полном сохранении нативности белка по решающему комплексу показателей. Для денатурированного белка возможны еще более разнообразные модификации. Исходное (нативное) и конечное (денатурированное) состояния белка сильно варьируют в зависимости от условий среды; поэтому при всей однотипности денатурационных превращений внешние их проявления непостоянны*.

К понятию денатурации некоторые авторы подходят схоластически. Например, американский ученый Нейрат и его сотр. (2) считают дена-

* Ни одному из признаков денатурации, отдельно взятому, нельзя приписать самодовлеющего значения. Это относится и к потере белком определенных биологических свойств. Последнее может произойти не только в результате коренного изменения структуры белковой молекулы (при денатурации), но и вследствие химических изменений определенных радикалов или потери простетической группы при сохранении макроструктуры, характерной для нативной формы белка.

турацией любое негидролитическое изменение белка. По этому предложению следует назвать нативным одно, произвольно выбранное состояние белка и считать денатурацией изменения совершенно различной природы (например, обратимое удаление простетической группы и тепловую денатурацию). Это лишает понятие денатурации реального значения и превращает его в бесплодную формальную абстракцию.

Для характеристики макроструктуры белковой молекулы существенно знать, каким образом осуществляется качественное ее изменение при денатурации — путем ли длительных постепенных переходов или разом, подобно взрыву. Скачкообразные качественные изменения, напоминающие взрыв, обычны для превращений молекул сравнительно простых веществ. Например, при гидролизе дипептида те молекулы, которые по содержанию энергии и другим особенностям своего состояния достигают уровня «активации», быстро, как бы внезапно переходят в продукты реакции — аминокислоты. Промежуточные состояния молекул, в которых связи дипептида уже нарушены, а аминокислоты еще не образовались, очень кратковременны и могли бы быть открыты только специальными методами. Для молекулы белка с многочисленными внутренними связями вероятным казался бы иной тип перехода в новое состояние — постепенное изменение с относительно устойчивыми промежуточными фазами. Однако факты, в частности приводимые ниже, показывают, что денатурационное изменение белковой молекулы происходит не постепенно, а разом*.

Установлено, что если определенная масса индивидуального белкового вещества при данных условиях среды денатурируется постепенно, то такие изменения, как увеличение вязкости, ослабление специфических функций (например ферментативной), усиление реактивности определенных радикалов и др., идут строго параллельно. При любой степени денатурации отношение количества белка, которое может быть выделено в характерном денатурированном состоянии, к тому количеству белка, которое еще обнаруживается в нативном состоянии, вполне соответствует степени денатурации, устанавливаемой по одному из показателей, например увеличению вязкости (3, 4, 6, 7). Естественно принять, что все постепенные изменения отражают изменяющееся количественное соотношение между молекулами, еще оставшимися в нативном состоянии, и молекулами, уже претерпевшими денатурационное превращение. Последнее для каждой молекулы белка протекает скачкообразно, как и в случае простых молекул при превращениях, заключающихся, например, в разрыве одной химической связи.

Придерживаясь представления о постепенности изменения белковой молекулы, нам пришлось бы вышеуказанное соответствие считать случайным, что вряд ли возможно. Далее, предположение о постепенности перехода требует, чтобы при частичной денатурации все молекулы белка находились в соответствующем промежуточном состоянии. Ошибочность этого представления показывают недавно проведенные А. С. Цыперовичем опыты, описание которых и приводится ниже.

В первой серии опытов исследовался яичный альбумин. В случае, если денатурационные изменения происходят постепенно, частично денатурированный яичный альбумин должен состоять из молекул, сульфгидрильные группы которых реактивны в такой мере, в какой вся масса белка претерпела денатурацию. Чтобы проверить это, мы проводили денатурацию мочевиной в присутствии $K_3Fe(CN)_6$ при условиях, обеспечивающих полноту окисления реактивных SH-групп белка. Затем из

* Для обозначения подобного изменения в литературе применялось выражение «все или ничего». Раньше, наряду со словом «скачкообразность», оно использовалось нами (3-5). Сохраняя имевшее хождение выражение «все или ничего», мы лишь стремились подчеркнуть, что данное скачкообразное изменение происходит разом, подобно взрыву. Однако здесь нами допущена ошибка. Принцип «все или ничего» имеет другой смысл, он метафизичен и должен быть безусловно отброшен.

реакционной смеси выделялась та часть белка, которая не осаждается при изоэлектрической точке (нативная фракция). Определения показали, что такой белок по содержанию SH-групп, выявляемых при полной денатурации, не отличается от исходного, нативного белка. В одном опыте, например, после окисления в процессе денатурации 52% сульфгидрильных групп белка была выделена растворимая фракция с содержанием сульфгидрильных групп, соответствующим 0,96% цистеина, — таким же, как и у исходного белка. Если бы при действии денатурирующего агента белковые молекулы находились в определенном промежуточном состоянии, то все они приняли бы участие в реакции с $K_3Fe(CN)_6$ и сохранили бы 48% сульфгидрильных групп. Очевидно, молекулы, оставшиеся растворимыми, нативными, вовсе не реагировали с $K_3Fe(CN)_6$. Зато, как показывает количественное сопоставление, у той части белка, которая стала нерастворимой в изоэлектрической зоне, окислялись все SH-группы. Следовательно, при частичной денатурации белка нет соответствующего частичного активирования SH-групп каждой белковой молекулы, а имеет место скачкообразное повышение реактивности всех SH-групп в молекулах денатурированной части белка.

В качестве доказательства постепенности изменения белковой молекулы приводят опыты Нейрата и Саум (8), будто бы показавшие постепенное изменение формы молекул сывороточного альбумина при увеличении концентрации денатурирующего вещества — мочевины. Расчеты Нейрата и Саум во многом опровергнуты работами С. Е. Бреслера (9) и А. Г. Пасынского и Р. С. Черняк (10). Но эти работы не решают вопроса о скачкообразности или постепенности превращения белковой молекулы. В развитие данных А. С. Цыперовича (4) нами были проведены опыты на сывороточном альбумине. Растворы белка, частично денатурированного мочевиной, без удаления последней исследовались в аппарате для электрофореза. Были обнаружены две четкие электрофоретические границы, одна соответствующая нативному, другая — денатурированному белку. Последний движется медленнее нативного, причем каждая из форм белка электрофоретически однородна. Если бы молекулы белка находились в состоянии, промежуточном между нативным и денатурированным, то имелась бы одна граница с промежуточной подвижностью.

Итак, еще раз подтверждено, что коренное, качественное изменение макроструктуры белковой молекулы при ее денатурации происходит разом и что промежуточные состояния (очевидно, из-за неустойчивости) не обнаруживаются обычными методами. Скачкообразность денатурационного превращения свидетельствует о том, что укладка полипептидных цепей в глобуле создается связями, находящимися во взаимной зависимости.

Институт биохимии
Академии наук УССР

Поступило
7 XII 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ О. В. Лобачевская, Укр. биохим. журн., 23, № 3 (1951). ² Н. Neurath, J. Greenstein et al., Chem. Rev., 34, 157 (1944). ³ А. С. Цыперович, Укр. биохим. журн., 20, 108 (1948). ⁴ А. С. Цыперович, там же, 21, 44 (1949). ⁵ В. А. Белицер, Усп. биол. хим., 1, 53 (1950). ⁶ К. И. Страчицкий и Н. Г. Плотникова, Укр. биохим. журн., 20, 187 (1948). ⁷ M. L. Anson, Adv. in Protein Chem., 2, 361 (1945). ⁸ Н. Neurath and A. Saum, Journ. Biol. Chem., 128, 357 (1939). ⁹ С. Е. Бреслер, Биохимия, 14, 180 (1949). ¹⁰ А. Г. Пасынский и Р. С. Черняк, ДАН, 79, 1001 (1951).