

А. Р. ЕГИАЗАРОВА, Л. А. ХАНАМИРЯН

## СПОНТАННАЯ АГРЕГАЦИЯ БЕЛКОВ ПРИ ИХ СТАРЕНИИ

В работе показана линейная зависимость роста коэффициентов преломления растворов бычьего сывороточного альбумина, глобулярного актина и трипсина от длительности их хранения.

Исследование физико-химических свойств белков, как правило, связано с использованием их препаратов в течение относительно длительного времени, что, в частности, вызвано необходимостью получения статистически достоверных результатов. При этом экспериментаторы исходят из допущения, что если соблюдаются определенные стандартные условия хранения растворов белка, его молекулы сохраняют свои нативные свойства. Однако легкость, с которой у ряда белковых молекул изменяется конформация при мягких условиях денатурации наводит на мысль о возможности возникновения в них аналогичных изменений при их старении без воздействия денатурирующих агентов.

Известна способность многих глобулярных белков к агрегации, приводящая к образованию фибрилл. Биологическая важность трансформации глобула-фибрилла была подчеркнута Сент-Дьердьи в 1945 году, по предположению которого глобулярная форма является основной формой белка и, вероятно, все фибриллярные белки состоят из глобулярных частиц [12].

Молекулы глобулярных белков при денатурации (повышение температуры, давления, изменение рН и состава среды) становятся асимметричными, что приводит, в частности, к заметному увеличению растворов [4, 8, 11]. Это обстоятельство может быть вызвано их агрегацией. Так, например, в случае ассоциации молекул яичного и сывороточного альбуминов образуются агрегаты, число частиц в которых варьирует в широких пределах в зависимости от условий эксперимента.

Предполагается, что агрегация может быть вызвана разрушением водородных связей, развертыванием полипептидной цепочки молекул [7]. Опыты с сывороточным альбумином лошади показали, что при хранении этого белка при комнатной температуре через два месяца на электрофореграмме отмечается появление более тяжелой компоненты с молекулярным весом 95 000 вместо 68 000.

Особый интерес представляет собой глобулярный актин—Г-актин. Его способность легко трансформировать в фибриллярную форму (Ф-актин) и образовывать с миозином комплекс актомиозина играет важную роль в функционировании не только мышц, но, возможно, и

многих мембран, поскольку известно, что актомиозиноподобные белки обнаружены в мембранах клеток печени, почек и нервов [2, 3]. В фундаментальной работе японских ученых [9] теоретически исследована способность глобулярных белков, в частности Г-актина, переходить из мономерной в различные полимерные формы. На основе статистической термодинамики проведен анализ кинетики процесса агрегации, условий его обратимости. Показано, что, как и в случае молекул сывороточного альбумина, длина агрегатов Г-актина может быть различной, в зависимости от температуры нагревания [5]. Проведенный авторами теоретический анализ характера денатурации [5], наступающей при агрегации молекул Г-актина, приводит к отрицанию необходимости развертывания молекул. Агрегация, по их мнению, является результатом образования слабых межмолекулярных связей, подобных силам Вандер-Ваальса, водородным или солевым мостикам. Возникновение мостиков подтверждается результатами работы [10], в которой методом полиакриламидного геля в додецилсульфате натрия обнаружены 4 пика Г-актина, соответствующие мономеру, димеру, тримеру и тетрамеру.

Более сложным объектом исследования по сравнению с сывороточным альбумином является трипсин из-за его неустойчивости, вызванной автолизом. Поэтому величина молекулярного веса его варьирует в широких пределах. Известно, что молекулы трипсина в растворе способны к ассоциации, положение равновесия между мономером и агрегированной формой зависит от ионной силы раствора, концентрации белка и других факторов. Таким образом, на примере трех вышеуказанных белков видно, что все они способны к агрегации, скорость которой зависит от многих факторов.

Цель настоящей работы заключалась в выяснении влияния фактора времени на конформационные изменения молекул белков, обладающих способностью к агрегации. В качестве объекта исследования были использованы бычий сывороточный альбумин, глобулярный актин и трипсин.

*Материал и методика.* Используемые препараты БСА и трипсина были в виде порошка, а Г-актин был получен из поперечно-полосатых мышц кролика по методу Штрауба с модификациями. Растворы белков готовились непосредственно перед опытом: актин и БСА растворялись в бидистиллированной воде, а трипсин—в буфере трис HCl pH 6,8.

Критерием изменения свойств молекул исследованных растворов служил показатель преломления, определяемый рефрактометром ИРФ-23 с точностью до  $10^{-6}$ . Источником света служила натровая лампа с  $\lambda = 589,3$  мкм. Температура растворов во время измерений, длившихся несколько минут, поддерживалась при  $20^\circ \pm 0,1$  с помощью ультратермостата. (Колебание температуры более 0,2 оказывало заметное влияние на величину показателя преломления). Растворы белков хранились в холодильнике при температуре, близкой к нулю, в сосудах с притертой пробкой. Из исходного раствора белка с высокой концентрацией (3—4 мг/мл) были приготовлены образцы с различной концентрацией, минимум которой составлял 0,025—0,045 мг/мл. Результаты измерений были статистически обработаны.

*Результаты и обсуждение.* На рис. 1 показан рост показателя преломления растворов Г-актина как функции времени хранения и концен-

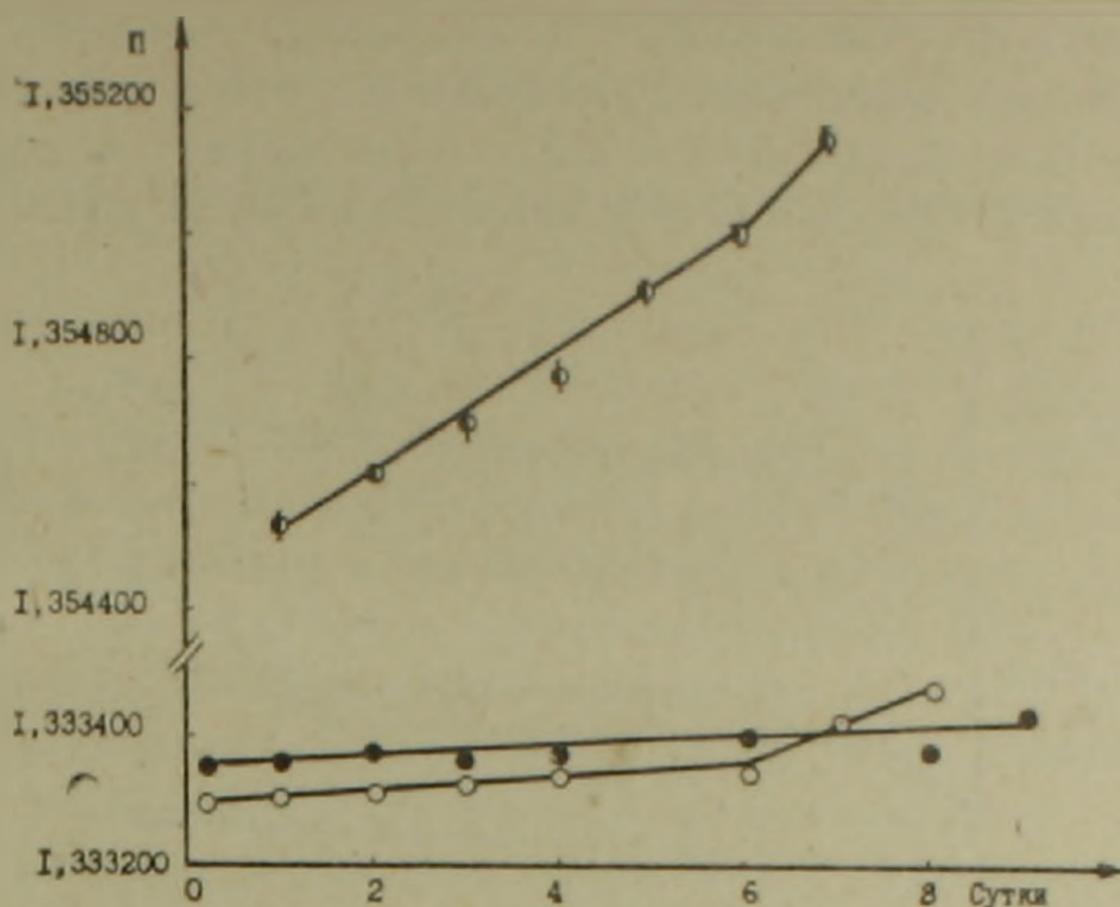


Рис. 1. Зависимость показателя преломления раствора глобулярного актина от концентрации и времени хранения. Ось ординат — показатель преломления, ось абсцисс — время в сутках. Концентрация растворов в мг/мл: ○ — 0,045, ◐ — 1,00, ◑ — 1,50, ● — 2,00 и ◕ — 3,0.

трации. Наименьшее изменение этого показателя за 9 суток хранения наблюдается у растворов с концентрацией 0,045 мг/мл. Однако увеличение при этой концентрации является величиной достоверной ( $P < 0,001$ ). Чем выше концентрация исследуемого раствора белка, тем быстрее и на большую величину увеличивается показатель преломления.

Аналогичная картина наблюдается в отношении растворов бычьего сывороточного альбумина. Значения показателя преломления этих белков очень близки.

С помощью метода наименьших квадратов было вычислено изменение инкремента показателя преломления этих белков как функции времени их хранения. В таблице на примере растворов Г-актина показано увеличение инкремента показателя преломления.

Таблица  
Зависимость инкремента показателя преломления растворов Г-актина (1 мг/мл) от старения

Время хранения белка	Инкремент показателя преломления
2 часа	0,000186
1 сутки	0,000198
2 суток	0,000200
3 суток	0,000213
4 суток	0,000221
9 суток	0,000250

Рост показателя преломления растворов трипсина за тот же промежуток времени происходит гораздо быстрее, чем у растворов Г-актина и БСА (рис. 2). Это, вероятно, можно объяснить автолизом трипсина и накоплением в растворе продуктов его переваривания.

Рост показателя преломления, по-видимому, является следствием агрегации молекул в растворе, наступающей в отсутствие денатурирующих агентов. Имеющиеся данные в настоящее время не позволяют выяснить механизм образования агрегатов, характер изменения конфор-

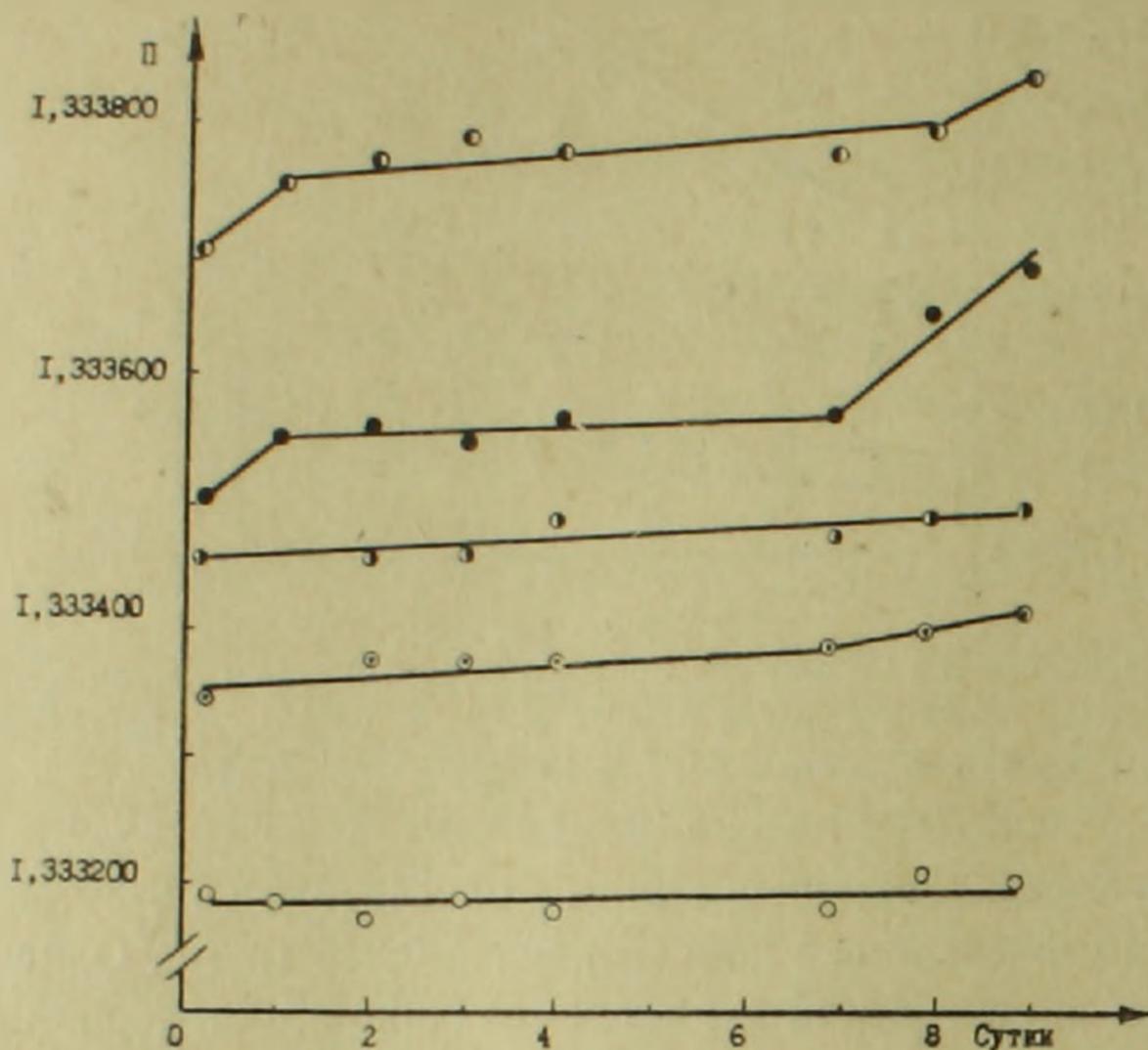


Рис. 2. Зависимость показателя преломления растворов белков от времени хранения. Ось ординат—показатель преломления, ось абсцисс—время в сутках. Белки: ○—БСА, ●—Г-актин, ■—трипсин. Концентрация—1 мг/мл.

мации молекул. Для выяснения этого сложного процесса необходимо, как нам кажется, вести комплексное исследование свойств молекул, применяя методы, позволяющие судить не только об изменениях формы и размера молекул, но и заряда, поскольку агрегация может быть следствием выхода на поверхность молекулы заряженных групп, ранее скрытых в ней. Таким методом может, в частности, служить исследование свойств молекул в монослое на поверхности раздела фаз жидкость—воздух. В 1966 г. [1] с помощью этого метода были зафиксированы конформационные изменения в молекулах миозина, наступавшие при облучении их растворов дозами порядка лишь 50 р.

Таким образом, согласно нашим данным, белки, хранящиеся в стандартных условиях (низкая температура, отсутствие доступа воздуха, постоянство рН растворов) агрегируют. Указанное повышение молекулярных весов необходимо иметь в виду при интерпретации экспериментальных данных, поскольку даже 1% полимеризация может повысить молекулярный вес, например, Г-актина на 20 000 по сравнению с мономером [6].

Ա. Ռ. ԵՂԻԱԶԱՐՈՎԱ, Լ. Հ. ԽԱՆԱՄԻՐՅԱՆ

## ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ՍՊՈՆՏԱՆ ԱԳՐԵԳԱՑԻԱՆ ՆՐԱՆՑ ԾԵՐԱՑՄԱՆ ԸՆԹԱՑՔՈՒՄ

## Ա մ փ ո փ ու մ

Եզան շիճուկային ալբումինի, գլոբուլյար ալտինի և տրիպսինի օրինակի վրա ցույց է տրվում, որ սպիտակուցների լուծույթների երկարատև պահպանումը (7—8 օր) ստանդարտ պայմաններում՝ հաստատուն pH, զերոյին մոտ ջերմաստիճան, դենատուրացնող գործոնների բացակայության դեպքում հանգեցնում է նրանց բեկման ցուցիչների կայուն փոփոխության, որը կարող է առաջանալ մոլեկուլների ագրեգացիայի շնորհիվ, որպես ժամանակի ընթացքում նրանց կոնֆորմացիոն փոփոխությունների հետևանք:

Մոլեկուլյար կշռի նշված աճը անհրաժեշտ է հաշվի առնել սկսած սպիտակուցային պրեպարատների ստացման երկրորդ օրից:

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Надарейшвили К. Ш., Егуазарова А. Р. Радиобиология, 6, 4, 1966.
2. Нейфах С. А., Василец И. М. Вопросы медицинской химии, 10, 3, 1964.
3. Таимухамедов Б. А., Халмурадов А. Г., Патхидинов П. Укр. биохим. журн. 40, 2, 1968.
4. Шульмина А. И., Ильина Ю. Н., Афанасьев П. К. Биохимия, 35, 3, 1970.
5. Barbu E., Joly M. Disc. Faraday Soc., 13, 1, 1953.
6. Grant R. J., Cohen L. B., Clarcee E. E., Hayashi T. Biochem. Biophys. Res. Commun., 16, 1, 1964.
7. Holt J. C., Cruth J. M. Biochem. J., 129, 1, 1972.
8. Jensen E. V., Hospelhorn V. D. et. al. J. Biol. chem., 185, 1, 1950.
9. Oosava F., Hayashi S. Progress Theoretical Biologi, 1, 1, 1967.
10. Sakakibara I., Jagi K. Biochem. Biophys. Acta, 207, 1, 1970.
11. Suzuki Ch., Suzuki K. Arch. Biochem. Biophys., 102, 2, 1963.
12. Szent-Gyorgyi A. Acta Physiol. Scand., 9. suppl. 25, 33, 1945.