

Г. С. КОМОЛОВА, И. А. ЕГОРОВ, Т. Б. ВАСИЛЬЕВА,
В. Ф. МАКЕЕВА

РАЗДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ ФОТОЛИЗА РИБОНУКЛЕАЗЫ МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ

(Представлено академиком А. И. Опариным 25 VI 1969)

В последнее время рибонуклеаза, как фермент с достаточно хорошо выясненной структурой, часто используется в качестве модельного объекта в исследовании механизма действия на ферменты ионизирующей и ультрафиолетовой радиации. Однако на природу лучевых повреждений РНКазы существуют весьма противоречивые взгляды. Ряд авторов считает наиболее уязвимым местом в ее молекуле дисульфидные связи, поддерживающие третичную структуру и обеспечивающие нативную конформацию активного центра (1-4). В то же время есть данные, свидетельствующие о том, что разрыв дисульфидных связей не является определяющим в лучевой инактивации РНКазной молекулы (5-7).

Юнгу и Хесслеру (1-9) удалось разделить на колонке из сефадекса продукты радиолитического распада РНКазы (7-9). Выяснилось, что уменьшение активности фермента при облучении обусловлено возникновением конформационно измененных нативных молекул, присутствующих в мономерной или димерной форме. При этом преобладающей роли в механизме лучевой инактивации фермента каких-либо аминокислотных остатков, в том числе и остатка цистина, выявлено не было.

Ранее нами был показан идентичный характер изменения оптических свойств и ионизируемости тирозиновых остатков в РНКазе, облученной у.-ф. и рентгеновским излучениями (10). В данной работе облученные у.-ф. светом растворы РНКазы подвергались разделению на колонке из сефадекса и исследовались на состояние дисульфидных групп. Полученные результаты сравнивались с аналогичными литературными данными по денатурации РНКазы при действии ионизирующих излучений.

В опытах использованы очищенные кристаллические ферментные препараты РНКазы. Растворы фермента готовились на бидистиллированной воде в концентрации 3 мг/мл. Объем облучаемой жидкости 1 мл. Температура не превышала 4°. В качестве облучателя использован интегральный источник у.-ф. излучения — лампа СВД-120 А. Интенсивность у.-ф. света в области длин волн 240—300 мμ, замеренная дозиметром УФИ-65, составляла 3,9 дж/м²·сек.

Продукты фотолиза РНКазы разделялись методом гель-фильтрации на колонке из Сефадекса Г-100. На колонку размером 1,5 × 50 см наносили 3 мг белка, растворенного в 1 мл ацетатного буфера рН 6.

Фракции элюата исследовали на содержание белка по Лоури (11) и на ферментативную активность по Анфинсену (12). Сульфгидрильные группы определялись методом амперометрического титрования по Бенешу (13), дисульфидные — тем же методом в модификации Картера (14).

Используемая в опыте РНКазы достаточно однородна, так как выходит с колонки одним пиком (рис. 1а). Облучение ведет к возникновению гетерогенности в морфологии ферментных молекул. Как следует из хроматограммы РНКазы, облученной дозой, вызывающей инактивацию 15% (рис. 1б), кроме пика I, соответствующего нативной фракции, появляется небольшой пик II, сдвинутый по сравнению с пиком I влево.

Представляет интерес тот факт, что во вновь возникшей фракции ферментативная активность полностью отсутствует. Дальнейшая инактивация рибонуклеазы сопровождалась более четким выявлением пика II, уменьшением пика I и появлением нового пика III в области, соответствующей 20—30 мл вышедшего элюата (рис. 1 *в*, *г*).

Пик I соответствует активной нативной фракции, пик II — денатурированной неактивной, в то же время как во фракции, соответствующей пику III, обнаруживается некоторая энзиматическая активность.

Как следует из табл. 1, при 15% инактивации РНКазы определяется 0,040 мкв/мг SH-групп. Так как при восстановлении сульфитом натрия в молекуле РНКазы разрывается 4 дисульфидных связи, а это, согласно нашим определениям, соответствует 0,168 мкв/мг SH-групп, то полученное количество SH-групп должно соответствовать 1 разорванной S—S-связи на молекулу.

Эффект, достигнутый при 15% инактивации фермента с дальнейшим облучением не изменяется. Это свидетельствует о том, что уже в начале облучения во всех молекулах РНКазы происходит разрыв одной S—S-связи и дальнейшие денатурационные изменения в ферментных молекулах не сопровождаются поломками дисульфидных мостиков. Суммарное количество SH-групп в нативной и облученной различными дозами у.-ф. света РНКазе оказалось одинаковым.

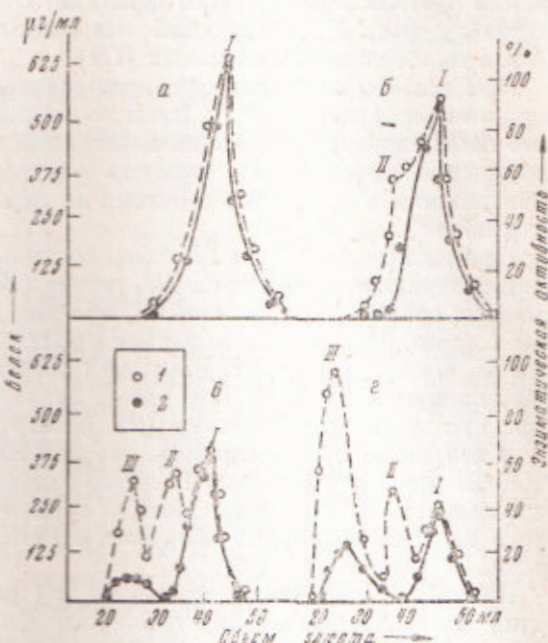


Рис. 1. Хроматографическое разделение рибонуклеазы, облученной у.-ф. светом. *а* — необлученная; *б-г* — облученная: *б* — инактивация 15%, *в* — 49%, *г* — 70%. *1* — количество белка, *2* — энзиматическая активность. Объяснения в тексте

Таблица 1

Образование SH-групп в РНКазе под влиянием у.-ф. излучения (мкв. на 1 мг белка; средние из 7 определений)

№№ п. п.	Инактивация, %	SH-группы		S—S-группы*
		до восстановл.	после восстановл.	
1	0	0,000	0,168	0,168
2	15	0,040	0,168	0,124
3	40	0,040	0,164	0,128
4	70	0,040	0,166	0,124
5	90	0,040	0,168	0,124

* Содержание S—S-групп вычислялось по разнице SH-групп, содержащихся в белке до и после обработки сульфитом натрия в 8 M мочевины.

Следовательно, в условиях умеренных доз у.-ф. излучения (инактивация 15—90%) единственным путем изменения S—S-связей является их восстановление до сульфидгидрильных групп, и при этом из одной дисульфидной связи возникают две сульфидгидрильных.

Полученные данные свидетельствуют о том, что потеря активности РНКазы при облучении ее растворов у.-ф. светом не может быть обусловлена денатурацией (в какой-то степени) всех ферментных молекул, но лишь определенной их части. Это выражается в появлении при гель-фильтрации фотолизатов РНКазы фракции, соответствующей необлученному ферменту (пик I), и фракций неактивных денатурированных молекул (II), а также частично активных (III).

При гель-фильтрации продуктов радиолитического распада рибонуклеазы выявлены аналогичные фракции (7-9). Этим подтверждается справедливость сделанного нами ранее, на основании исследования спектральных свойств и ионизируемости тирозиновых остатков облученной рибонуклеазы, вывода о идентичности в механизме действия на фермент рентгеновского и у.-ф. излучений (10).

Неактивные молекулы РНКазы, составляющие фракцию II и частично присутствующие во фракции III, должны быть конформационно измененными по сравнению с нативными, ибо пик II сдвинут по сравнению с пиком I влево. Мы уже высказывали предположение (10) на основании данных по ионизируемости тирозиновых остатков в облученной и необлученной молекуле РНКазы о том, что ее лучевая инактивация не сопровождается, как это иногда полагают (15), разворачиванием структуры молекулы.

В данной работе выяснилось, что при 90% инактивации на 1 молекулу РНКазы приходится только 1 дисульфидная поломка. Независимость числа поломок от степени инактивации свидетельствует о том, что они имеют место во всех молекулах облученной РНКазы, независимо от их нативности.

Пик I соответствуют молекулы с 1 разорванной связью, но обладающие такой же, как необлученные, активностью и способностью элюироваться с колонки из сефадекса. Следовательно, заметного разворачивания структуры молекулы при инактивации не происходит.

Однако неактивные молекулы фотолизатов выходят из колонки раньше нативных, и их следует считать морфологически модифицированными в смысле потери компактности структуры. Не исключено, что это обусловлено нарушением слабых связей типа водородных в области активного центра из-за окисления тирозиновых групп, принимающих участие в формировании его топографии (6, 16).

Юнг и Хесслер указывают на значительную роль в механизмах лучевой инактивации РНКазы фактора увеличения молекулярного веса (7-9). Согласно их данным, в случае ионизирующих излучений фракция III состоит из активных и неактивных димеров РНКазы. Очевидно, возникновение аналогичной фракции III при облучении растворов РНКазы у.-ф. светом также связано с процессом агрегации активных и неактивных ферментных молекул.

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

Поступило
19 VI 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ G. A. Hayden, F. Friedberg, *Radiation Res.*, **22**, 11, 130 (1964). ² E. Slobodian, W. Newman et al., *Biochim. et biophys. acta*, **111**, 181 (1965). ³ A. D. McLaren, R. A. Lase, *Science*, **134**, 3482 (1961). ⁴ L. G. Rugenstine, *Adv. in Enzymology*, **24**, 359 (1962). ⁵ I. S. Haskill, I. W. Hunt, *Biochim. et biophys. acta*, **105**, 333 (1965). ⁶ В. И. Максимов, В. И. Осипова, Е. Д. Каверзнева, *Биохимия*, **32**, 2 (1967). ⁷ H. Schüssler, H. Juny, *Zs. Naturforsch.*, **21b**, 6, 614 (1967). ⁸ H. Juny, H. Schüssler, *Zs. Naturforsch.*, **21b**, 3, 224 (1966). ⁹ H. Schüssler, H. Juny, In: *Molekulare Struktur und Strahlenwirkung*, 1968. ¹⁰ Г. С. Комолова, Е. В. Беликова, И. А. Егоров, *Радиобиология*, **9**, 4 (1969). ¹¹ H. O. Lowry, T. N. Rosebrough et al., *J. Biol. Chem.*, **193**, 1, 165 (1951). ¹² C. V. Anfinsen, R. R. Redfield et al., *J. Biol. Chem.*, **207**, 201 (1954). ¹³ R. E. Benesch, H. A. Lardy, R. I. Benesch, *J. Biol. Chem.*, **216**, 663 (1955). ¹⁴ I. R. Carter, *J. Biol. Chem.*, **234**, 1705 (1959). ¹⁵ H. Müller, *Acta Biol. et med. Germ.*, **16**, 5, 565 (1966). ¹⁶ E. Slobodian, M. Fleischer, *Biochemistry*, **5**, 2192 (1966).