

Е. А. САБУРОВА, Д. С. МАРКОВИЧ,  
член-корреспондент АН СССР М. В. ВОЛЬКЕНШТЕЙН

## ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И КОНФОРМАЦИОННАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ МЕТМИОГЛОБИНА БЫКА

К настоящему времени накопилось большое количество данных о влиянии низкомолекулярных соединений — коферментов, субстратов, ингибиторов на конформационную стабильность ферментов по отношению к различным денатурирующим агентам: температуре, мочевины, детергентам и к действию протеолитических ферментов. Хороший обзор по этим работам сделал В. Я. Александровым (1). Большой интерес представляет в них корреляция между тепловой стабильностью белков и их чувствительностью к протеолизу. Известно, что нативные белки менее чувствительны к протеолизу, чем денатурированные. Не исключено, что действию протеолитических ферментов в клетке предшествует частичная или полная денатурация белков-субстратов в лизосомах (2). С другой стороны, возможно, что частичное разворачивание молекулы ферментов происходит в процессе длительного функционирования (3), а также при ингибировании (4) или в результате взаимодействия с протеазами (5). Эти вопросы еще недостаточно изучены, хотя имеются определенные успехи в исследовании механизмов регулирования активности ферментов в клетке путем специфического изменения их протеолитической чувствительности низкомолекулярными регуляторами (6).

Цель наших исследований заключается в попытке выразить связь конформационной стабильности белков с их протеолитической чувствительностью через определенные параметры структуры и термодинамической стабильности. В предыдущей работе изучалась термодинамика тепловой денатурации и обратимость ее для метмиоглобина (Mb) из сердечной мышцы быка (7). В настоящей работе исследуется стабильность нативного Mb к действию трипсина и характер протеолиза. Mb выделяли и фракционировали как описано ранее (7). Трипсин использовали фирмы «Спофа» (ЧССР). Mb в концентрации 1,5—1,8 мг/мл инкубировали с трипсином (0,2 мг/мл) в растворе 0,1 M NaCl, pH 7, при 22°. Протеолиз изучали следующим образом.

1. Исследование кривых тепловой денатурации Mb (условия измерения такие же, как в работе (7)): а) по изменению оптического поглощения при 410 мμ, б) по изменению удельного вращения при 233 мμ. Для этих двух методов на инкубационной смеси отбирали 0,4 мл раствора и доводили его до 4 мл боратым буфером, pH 10.

2. Определение содержания азота в надосадочной жидкости методом микро-Кьельдаля (8) после осаждения белка 2% раствором трихлоруксусной кислоты.

3. Изучение кривых потенциометрического титрования.

В течение 24 час. инкубации Mb с трипсином через каждые четыре часа раствор частично гидролизованного Mb исследовался одновременно всеми перечисленными методами. На рис. 1 приведены экспериментальные кривые тепловой денатурации Mb, определенные по изменению оптического поглощения при 410 мμ после 4 и 24 час. протеолиза (остальные кривые имеют подобный вид). Здесь же дана кривая тепловой денатурации нативного Mb, которая полностью совпадает с кривой денатурации, полученной в нулевой момент протеолиза. Как видно из рис. 1, с

увеличением времени протеолиза оптическое поглощение Mb падает, что характеризует изменения третичной структуры белка вблизи группы гема; поглощение денатурированного теплом миоглобина остается постоянным. Если представить эти кривые в координатах  $\theta = \theta(T)$ , где  $\theta(T)$  — отношение количества денатурированного при данной температуре Mb к общему количеству Mb, испытывающему температурный переход, то построенные в новых координатах все кривые тепловой денатурации совпадают. Отсюда следует, что совпадают температура и энтальпия переходов; изучение обратимости показывает, что совпадает также и степень обратимости денатурации на разных стадиях протеолиза. Эти параметры являются достаточно чувствительными к малым конформационным изменениям в Mb, вызванным как присоединением лигандов, так и частичной ионизацией боковых аминокислотных остатков (7, 9, 15). Это позволяет предположить, что наблюдаемые кривые денатурации полностью определяются денатурацией нативного Mb, не поврежденного трипсином. Можно предполагать, что при протеолизе Mb образуются структурированные фрагменты, которые «плавятся» при иных, чем нативный Mb, температурах, но этот эффект не проявляется при измерении поглощения в полосе Soret (это относится, например, к фрагментам, не содержащим гема, или к таким, в которых окружение гема уже достаточно изменено и при денатурации практически не изменяется). Такая возможность исключается, однако, при сопоставлении данных этого метода с кривыми денатурации, полученными по изменению удельного вращения при 233 м $\mu$ . Из кривых денатурации определяли величину  $f$ , равную отношению  $f = \epsilon_N^0 - \epsilon_N(t) / (\epsilon_N^0 - \epsilon_D)$ , где  $\epsilon_N^0$ ,  $\epsilon_N(t)$  и  $\epsilon_D$  — коэффициенты экстинкции Mb нативного, после  $t$  времени протеолиза и денатурированного теплом соответственно (все коэффициенты экстинкции определены вблизи перехода). Полученное таким образом отношение  $f$  совпадает во всем интервале времени протеолиза со значением  $f$ , полученным аналогичным образом из кривых денатурации по данным удельного вращения. Таким образом, не обнаружено упорядоченных фрагментов Mb, денатурирующих с другими, чем нативный Mb, параметрами. Из этих данных также можно сделать вывод, что молекулы Mb, имеющие разрывы, либо полностью потеряли компактную вторичную структуру, либо сохраняют ее и плавятся со всеми теми же параметрами, как и нативный Mb. Последнее предположение является маловероятным, поскольку, как уже упоминалось, термодинамические параметры тепловой денатурации являются весьма чувствительными к малым конформационным изменениям. Против этой возможности свидетельствуют также данные по содержанию азота в растворах Mb на разных стадиях протеолиза

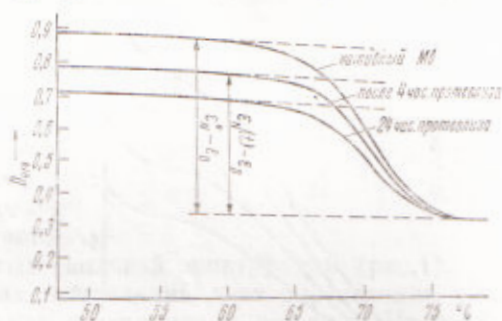


Рис. 1. Кривые тепловой денатурации Mb на разных стадиях протеолиза по данным оптического поглощения при 410 м $\mu$ ; 0,1 M боратный буфер, pH 10

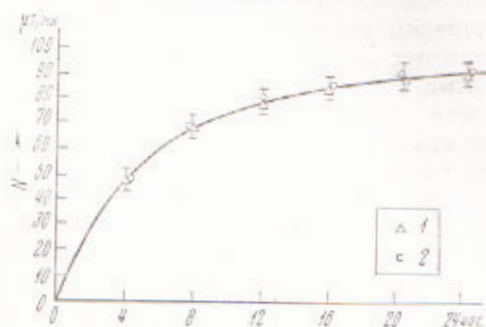


Рис. 2. Зависимость количества азота в растворе от времени протеолиза по методу микро-Кьельдаля (1) и из кривых тепловой денатурации (2)

величину  $f$ , равную отношению  $f = \epsilon_N^0 - \epsilon_N(t) / (\epsilon_N^0 - \epsilon_D)$ , где  $\epsilon_N^0$ ,  $\epsilon_N(t)$  и  $\epsilon_D$  — коэффициенты экстинкции Mb нативного, после  $t$  времени протеолиза и денатурированного теплом соответственно (все коэффициенты экстинкции определены вблизи перехода). Полученное таким образом отношение  $f$  совпадает во всем интервале времени протеолиза со значением  $f$ , полученным аналогичным образом из кривых денатурации по данным удельного вращения. Таким образом, не обнаружено упорядоченных фрагментов Mb, денатурирующих с другими, чем нативный Mb, параметрами. Из этих данных также можно сделать вывод, что молекулы Mb, имеющие разрывы, либо полностью потеряли компактную вторичную структуру, либо сохраняют ее и плавятся со всеми теми же параметрами, как и нативный Mb. Последнее предположение является маловероятным, поскольку, как уже упоминалось, термодинамические параметры тепловой денатурации являются весьма чувствительными к малым конформационным изменениям. Против этой возможности свидетельствуют также данные по содержанию азота в растворах Mb на разных стадиях протеолиза

после осаждения белка трихлоруксусной кислотой. На рис. 2 сопоставляются данные по содержанию азота, полученные методом микро-Кьельдаля и вычисленные следующим образом: из кривых денатурации по формуле  $fC_0$ , где  $C_0$  — начальная концентрация Mb, а  $f$  — упомянутое выше отношение, вычисляли количество Mb, не участвующего в тепловом переходе, и пересчитывали на содержание азота, исходя из известного аминокислотного состава (<sup>10</sup>).

Как видно из рис. 2, количество азота, полученное из кривых тепловой денатурации и по методу микро-Кьельдаля, равно в пределах ошибки эксперимента во всем изученном интервале времени протеолиза. Если

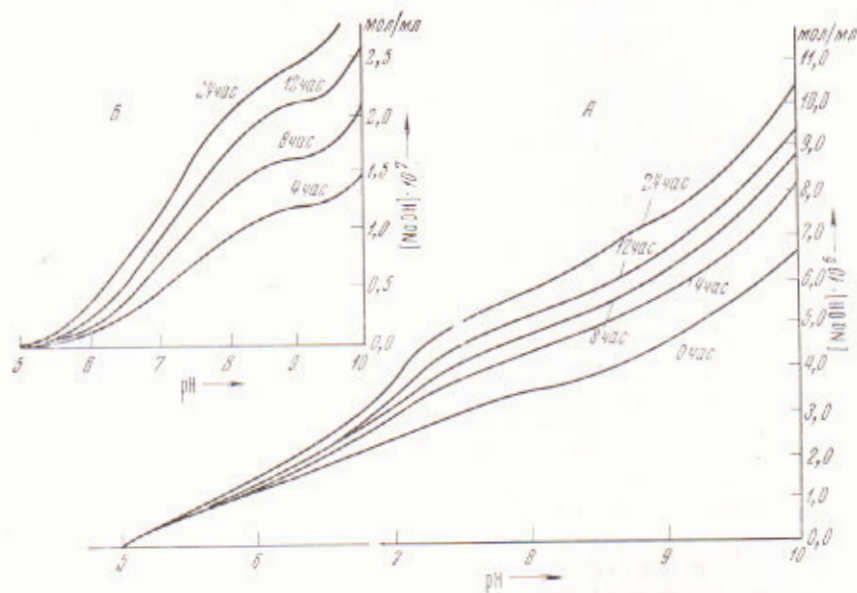


Рис. 3. А — потенциметрические кривые титрования Mb на разных стадиях протеолиза;  $C_{NaOH} = 0,0244 N$ ,  $C_{Mb} = 1,7$  мг/мл. Б — разностные кривые титрования Mb

после нескольких разрывов молекула не распадается на фрагменты, а сохраняет компактную структуру, то после обработки ТХУ в кислой среде она должна распасться. В этом случае метод микро-Кьельдаля дал бы завышенные результаты по сравнению с методом тепловой денатурации. Наличие нечувствительного к дальнейшему протеолизу «ядра», мы предполагаем, можно исключить по двум причинам. Во-первых, показано, что на разных стадиях протеолиза сохраняются все параметры тепловой денатурации Mb, причем такие же, как у нативного белка. Вторая причина следует из экспериментов по потенциметрическому титрованию Mb на разных стадиях протеолиза. Экспериментальные кривые титрования представлены на рис. 3А. На рис. 3Б приведены разностные кривые титрования, полученные путем вычитания кривой титрования Mb в нулевой момент протеолиза из кривых титрования Mb на разных его стадиях. Из рис. 3Б видно, что основной подъем на разностных кривых происходит при pH 7,2—7,3, что соответствует области титрования концевых аминокислот (<sup>11</sup>). В этой области могут давать вклад также освободившиеся в процессе протеолиза имидазольные группы, рК которых в Mb ~ 6,6 (для 6 из 12 гистидинов) (<sup>12</sup>). Если представить разностные кривые титрования как сумму кривых титрования гистидина с рК 6,6 и концевых аминокислот с рК 7,5, по мере увеличения времени протеолиза количество освободившихся имидазольных групп изменяется от 2—3 для 8 час. до 4—5 для 24 час. протеолиза. При pH > 9 в процессе протеолиза начинают титроваться дополнительные группы, по всей видимости аминокислотные

лизинных остатков. Число лизинных остатков в Mb равно 18 (рК 8,5—11) <sup>(13)</sup>. Вкладом тирозина в этой области можно пренебречь, исходя из данных по спектрофотометрическому титрованию тирозина в нативном Mb по методу <sup>(14)</sup>. Миоглобин быка содержит два тирозина <sup>(15)</sup>, рК одного из которых, по нашим данным, равно 10,1 рК другого находится в области, не достигаемой для титрования, т. е. > 12.

В табл. 1 приведены количества расщепленных пептидных связей  $n(t)$ , приходящихся на одну молекулу Mb, для разного времени протеолиза. Эти величины получены из соотношения:

$$n(t) = (N(t) - N_{\text{гист}}(t)) / f(t) C_0,$$

где  $N(t)$  — полное число оттитрованных групп в интервале рН 5,0—9,0, полученное из рис. 3Б;  $N_{\text{гист}}(t)$  — число гистидиновых остатков, освободившихся в процессе протеолиза, вычисленное, как уже говорилось, из этих же кривых;  $f(t) C_0$  — число расщепленных трипсином молекул, полученное из кривых тепловой денатурации (рис. 4).

Основной вклад в ошибку этих вычислений дает определение числа ставших доступными для титрования гистидиновых остатков. Из табл. 1 видно, что с увеличением времени протеолиза глубина его возрастает, хотя полная активность трипсина в этом растворе падает (активность трипсина в инкубационной смеси определяли по казеину). Увеличение глубины протеолиза свидетельствует о постепенном характере расщепления пептидных связей, хотя разрушение пространственной структуры молекулы Mb происходит «взрывообразно», так как продукты протеолиза, имеющие упорядоченную вторичную структуру, не обнаружены. В Mb 75% аминокислотных остатков входят в  $\alpha$ -спиральные участки, и поэтому можно было ожидать, что и фрагменты хотя бы частично сохраняют свою вторичную структуру. По-видимому,  $\alpha$ -спиральные участки вне нативной третичной структуры малостабильны.

Таким образом, в работе предлагается новый метод исследования протеолиза нативных белков, заключающийся в анализе кривых тепловой денатурации на разных стадиях протеолиза. Этим методом в совокупности с вышеперечисленными методами показано, что при протеолизе Mb трипсином в растворе имеются нативные молекулы и фрагменты, не имеющие  $\alpha$ -спиральной структуры; глубина протеолиза постепенно увеличивается со временем, что сопровождается появлением освободившихся групп, ранее титровавшихся аномально, а разрушение пространственной структуры происходит «взрывообразно».

Институт биологической физики  
Академии наук СССР  
Пушино-на-Оке

Поступило  
29 I 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> V. Y. Alexandrov, *Currents in Modern Biol.*, 3, 9 (1969). <sup>2</sup> J. W. Coffey, Ch. de Duve, *J. Biol. Chem.*, 243, 3255 (1968). <sup>3</sup> А. Д. Браун, А. Г. Бульчев, И. В. Фиженко, Тез. II Всесоюз. биохим. съезд, Ташкент, 2 секция, 1969, стр. 102. <sup>4</sup> D. Y. Graves, *J. Biol. Chem.*, 243, 6090 (1968). <sup>5</sup> L. K. Christiansen, C. R. trav. lab., Carlsberg, Ser. Chim., 28, 37 (1952). <sup>6</sup> R. T. Schimke, *Protein metabolism*, 4, 3 (1963). <sup>7</sup> Е. А. Сабурова, Д. С. Маркович, М. В. Волькенштейн, *Мол. биол.*, 5, № 3, 461 (1971). <sup>8</sup> A. Fleck, H. N. Munro, *Clin. chim. acta*, 11, 2 (1965). <sup>9</sup> B. P. Atanasov, *Intern. Symp. Comparative Hemoglobin Structure*, 1966, p. 13. <sup>10</sup> Kia-Ki Han et al., *Europ. J. Biochem.*, 16, 465 (1970). <sup>11</sup> C. Tanford, *Adv. Protein. Chem.*, 17, 70 (1962). <sup>12</sup> E. Breslow, F. R. N. Gurd, *J. Biol. Chem.*, 237, 371 (1962). <sup>13</sup> J. Oncly, *Rev. Modern Phys.*, 31, 52 (1959). <sup>14</sup> J. Hermans, *Biochemistry*, 1, 193 (1962). <sup>15</sup> B. Atanasov, S. V. Mutova, *Biochim. et biophys. acta*, 214, 69 (1970).