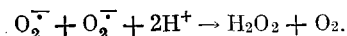


М. А. СИМОНЯН, Р. М. НАЛБАНДЯН

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ДЕНАТУРИРУЮЩИХ АГЕНТОВ
НА ПАРАМЕТРЫ СИГНАЛА Э.П.Р. МЕДЬСОДЕРЖАЩЕГО
БЕЛКА ИЗ ЭРИТРОЦИТОВ

(Представлено академиком Н. Н. Семеновым 9 IX 1971)

В ряде животных тканей обнаружены медьсодержащие белки с молекулярным весом $\sim 30\,000$ и двумя атомами меди на 1 молекулу (¹⁻⁵). Эти белки не функционируют в качестве оксидаз или переносчиков электронов, а, как следует из работ (^{6,7}), выполняют функции дисмутазы анион-радикалов кислорода, катализируя протекание следующего процесса:



Таким образом, физиологическая роль этих медьсодержащих белков, возможно, состоит в предохранении активно метаболизирующих тканей от повреждения радикалами, образующимися в реакциях одноэлектронного переноса к молекуле кислорода. С целью выяснения природы лигандных

атомов и симметрии окружения меди, входящей в состав активного центра фермента, в данной работе проведено изучение влияния денатурирующих агентов на спектр э.п.р. дисмутазы из бычьих эритроцитов.

Белок выделяли по методу Мак

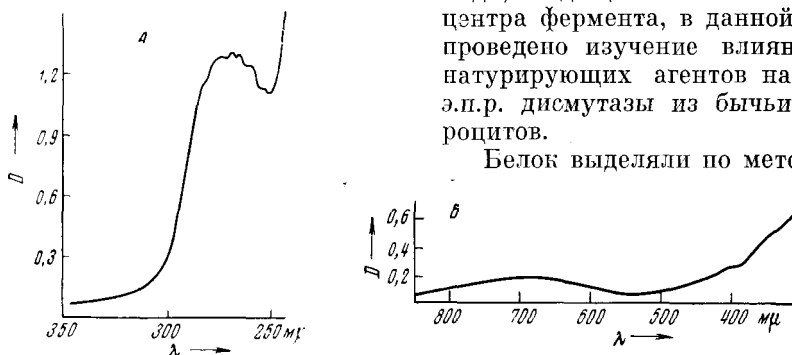


Рис. 1. Спектр дисмутазы в у.ф. (А) и видимой (Б) областях спектра.
 $l = 1\text{ см}; T = 295^\circ\text{ К}$

Корда и Фридовича (⁶) с некоторыми модификациями. Эритроциты отделяли из 8 л свежей крови, к которой для предотвращения свертывания добавляли глюкозу (2%) и цитрат. Эритроциты промывали 0,9% раствором NaCl и гемолизовали в дистиллированной воде. Строму удаляли центрифугированием при 5000 g в течение 20 мин. Гемоглобин осаждали добавлением смеси хлороформ — этанол, охлажденной до 20° С. К полученной вязкой смеси прибавляли воду (10% от общего объема) и центрифугировали 10 мин. при 3000 g. Красный осадок удаляли, а надосадочную жидкость фильтровали через плотный стеклянный фильтр для удаления мелких частиц гемоглобина. К образовавшемуся прозрачному желтоватому раствору добавляли K_2HPO_4 (300 г/л). Верхний слой отделяли, центрифугировали для удаления осадка и к прозрачному раствору добавляли охлажденный ацетон (0,75 объема). Образовавшийся осадок суспендиро-

вали в небольшом количестве воды и диализовали против 0,0025 *M* фосфатного буфера при pH 7. После диализа суспензию центрифугировали и прозрачный раствор вводили в колонку с ДЭАЭ-целлюлозой ($1,2 \times 20$), уравновешенную фосфатной буферной смесью (0,0025 *M*). Колонку последовательно промывали 0,005; 0,01; 0,05 и 0,1 *M* буферами и синезеленую фракцию элюировали 0,2 *M* буфером. Эту фракцию обессоливали на колонке с Сефадексом Г-25 и вводили во вторую колонку с ДЭАЭ-целлюлозой ($1,2 \times 8$). Колонку промывали 0,1 *M* буфером и белок элюировали 0,25 *M* буфером. Затем проводили гель-фильтрацию на колонке с Сефадексом Г-75.

Для получения оптических и спектров э.п.р. раствор белка концентрировали на небольшой колонке с ДЭАЭ-целлюлозой и диализовали против разбавленного фосфатного буфера (pH 7). Использованный в работе раствор имел оптическую плотность при 680 мμ, равную примерно 0,2 и отношение оптических плотностей $D_{280}/D_{680} \approx 20$. Величину pH растворов белка изменяли добавлением нескольких капель разбавленной КОН и концентрированной уксусной кислоты.

Как видно из приведенного на рис. 1 спектра, фермент характеризу-

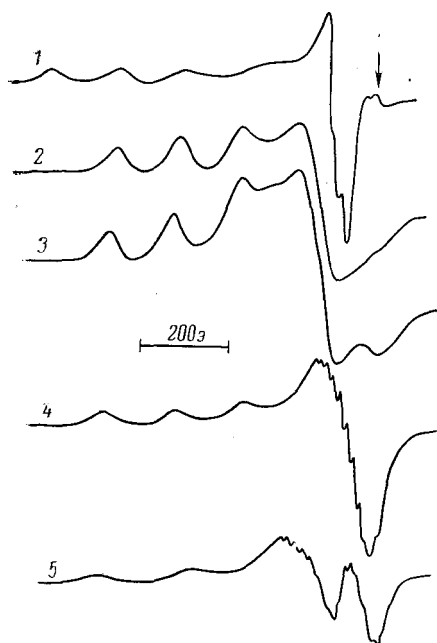


Рис. 2. Изменение формы сигнала э.п.р. дисмутаза при различных значениях pH: 1—4; 2—(6—11,5); 3—12; 4—13, $T > 77^\circ \text{K}$. Амплитуда модуляции 5 э

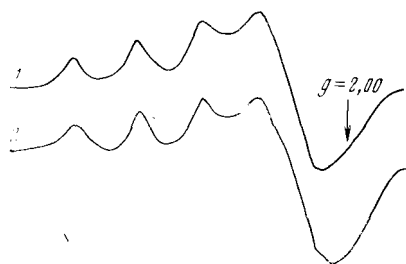


Рис. 3. Спектры э.п.р. дисмутаза в присутствии фторида (1) (pH приведено к 7) и смеси мочевины + додецилсульфат (2). $T = 77^\circ \text{K}$. Амплитуда модуляции 5 э

ется широкой полосой поглощения с максимумом при 680 мμ и плечами при 410 и 350 мμ. Таким образом, оптический спектр дисмутаза отличен от спектра синих медьсодержащих оксидаз (лакказы, церулоплазмиз, оксидаза аскорбиновой кислоты) и медьсодержащих белков-переносчиков электрона (пластоцианин, азурин, цитохромоксидаза). Параметры сигнала э.п.р. дисмутаза также отличны от параметров сигналов этих медьсодержащих белков.

Ни форма, ни интенсивность сигнала э.п.р. дисмутаза не изменяются (рис. 2) в диапазоне pH 6,0—11,5. Наблюдающийся при этих значениях pH сигнал характеризуется параметрами: $A_{\parallel} + 142$ э, $g_{\parallel} = 2,267$, $g_{\text{max}} = 2,082$, $\Delta H_{\text{гс}} = 66$ э (рис. 2, 2). Поскольку в спектре э.п.р. белка наблюдается только один набор компонент сверхтонкой структуры (с.т.с.), можно предположить, что оба атома меди белка находятся в одинаковом окружении. Выше и ниже указанных значений pH происходит изменение формы сигнала. При pH 12 сигнал имеет форму, типичную для комплексов меди с аксиальной симметрией (рис. 2, 3), с параметрами: $g_{\parallel} = 2,30$, $A_{\parallel} = 170$ э и $g_{\text{max}} = 2,08$. В районе $g_{\perp}$ обнаруживаются девять компонент

суперсверхтонкой структуры (с.с.т.с.) с константой расщепления 15 э. Хотя при этом значении рН форма сигнала отлична от наблюдающейся при более низких рН, однако происходящее изменение формы обратимо, поскольку подкисление до рН 7 вновь приводит к сигналу, показанному на рис. 1, Б. Наличие девяти компонент с.с.т.с. в спектре э.п.р. при рН 12 может свидетельствовать о том, что медь связана с четырьмя атомами азота.

При дальнейшем подщелачивании происходит необратимое изменение формы сигнала. При рН 13 (рис. 2, 4) сигнал имеет форму и параметры, характерные для биуретовых комплексов меди ($g_{\parallel} = 2,18$, $A_{\parallel} = 195$ э). Появление в оптическом спектре максимума при 535 мμ также свидетельствует об образовании при рН 13 биуретового комплекса меди. Подкисление раствора белка от рН 7 до 4 приводило к необратимому изменению формы сигнала э.п.р. (рис. 2, 1). Параметры сигнала э.п.р. при рН 4 имеют следующие значения: $g_{\parallel} = 2,36$, $A_{\parallel} = 150$ э, $g_{\max} = 2,08$. Подкисление раствора белка сопровождалось его обесцвечиванием.

Было исследовано влияние фторида, мочевины, додецилсульфата натрия и цетилтриметиламмония бромистого на форму сигнала э.п.р. дисмутаза. Инкубация белка с 10^{-4} мол/л фторида, 4,5 мол/л мочевины, 0,2% додецилсульфата (либо с 0,2% цетилтриметиламмония бромистого) при 20° в течение 1 часа не приводила к существенному изменению формы сигнала э.п.р., характерной для нейтральной и слабощелочной областей. Параметры сигнала не изменялись также при инкубации белка в течение часа одновременно с додецилсульфатом и мочевиной (рис. 3).

Денатурирующее действие детергентов обычно связывают с разрушением гидрофобных связей, вносящих вклад в стабилизацию нативной структуры белка, а денатурацию мочевиной — с разрушением водородных связей (⁸). Под влиянием мочевины происходят резкие изменения лигандного окружения меди в синих медьсодержащих оксидазах и белках, функционирующих в качестве переносчиков электрона (^{9, 10}).

Дисмутаза является примером медьсодержащего белка, в котором специфическое лигандное окружение меди не изменяется под действием агентов, разрушающих водородные связи. Тот факт, что форма сигнала э.п.р. дисмутазы под влиянием этих агентов не изменяется, может означать, что водородные связи не принимают участия в формировании активного центра данного белка. Приведенные данные, по-видимому, свидетельствуют о том, что водородные и гидрофобные связи в белке не определяют специфического лигандного окружения атомов меди дисмутазы, тогда как электростатические взаимодействия могут оказаться существенными

Институт биохимии
Академии наук АрмССР
Ереван

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
14 VII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ T. Mann, D. Keilin, Proc. Roy. Soc. B, 1939, 126. ² J. R. Kimmel, H. Markowitz, D. M. Brown, J. Biol. Chem., 234, 46 (1959). ³ H. Markowitz, G. E. Cartwright, M. M. Wintrobe, J. Biol. Chem., 234, 40 (1959). ⁴ R. J. Carriro, H. F. Ductsch, J. Biol. Chem., 244, 6087 (1969). ⁵ H. Porter, J. Folch, J. Neurochem., 1, 260 (1957). ⁶ J. M. McCord, J. Fridovich, J. Biol. Chem., 244, 6049 (1969). ⁷ J. M. McCord, J. Fridovich, J. Biol. Chem., 244, 6059 (1969). ⁸ C. Tenford, Adv. Protein Chem., 23, 122 (1968). ⁹ B. G. Malmström, T. Vänngård, J. Mol. Biol., 2, 118 (1960). ¹⁰ A. Finazzi-Agrò, G. Rotilio et al., Biochemistry, 9, 2009 (1970).