

УДК 577.158.4

БИОХИМИЯ

Л. Г. НАГЛЕР, Л. С. ВАРТАНЯН

ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА КСАНТИНОКСИДАЗЫ ИЗ МОЛОКА И ЕЕ ИЗМЕНЕНИЕ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПРОТЕАЗ

(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 14 VI 1973)

При диссоциации ксантин-О-оксидоредуктазы, КФ 1.2.3.2 (КО) в 6 *М* гуанидингидрохлориде ⁽¹⁾ или в додецилсульфате натрия (ДСН) ⁽²⁾ в зависимости от метода выделения фермента, времени его хранения и природы диссоциирующего агента КО может диссоциировать на различные фрагменты, молекулярные веса которых меняются от 150 000 до 15 000.

В настоящей работе изложены результаты экспериментов по действию трипсина (Т) и химотрипсина (ХТ) на КО и проведено сопоставление картины диссоциации в ДСН образцов фермента, хранившихся в течение разного времени и фермента, подвергнутого ограниченному протеолизу.

КО выделяли без применения панкреатина, как описано в работе ⁽²⁾. Образцы гомогенного в ультрацентрифуге фермента хранили при 4° в 0,1 *М* фосфатном буфере, содержащем 1 *мМ* ЭДТА и 1 *мМ* салицилат натрия. Электрофорез и определение молекулярных весов в 5% полиакриламидном геле, содержащем ДСН, проводили по методу Вебера и Осборна ⁽³⁾, а в 10% геле — по методу Леммли ^(4, 5). Денситометрирование проводили по ⁽²⁾. Относительные молярные концентрации компонентов рассчитывали как отношение площади пика, выраженной в процентах от суммарной площади, к молекулярному весу данного полипептида.

На рис. 1 представлены для сравнения результаты электрофореза в ДСН трех образцов КО, хранившихся разное время после выделения, и КО, обработанной Т и ХТ. Как видно из рис. 1 *а*, свежевыделенный образец диссоциирует в основном на две полипептидные цепи *А* и *В* (гель I), причем цепь *А* составляет 80% от общего количества фермента. В электрофоретической картине образцов, хранившихся разное время (гели II и III), наблюдается уменьшение содержания цепей *А* и *В* и накопление новых цепей *С*, *Д*, *Е* и *Ф*; цепь *Д* является промежуточным продуктом распада цепей *А* и *В* (гели I и II).

При переваривании Т и ХТ образуются в основном те же конечные продукты *С*, *Е* и *Ф* (гели IV и V) и те же промежуточные продукты *Д* (для ХТ) рис. 1 *в* и *В* (для Т) рис. 1 *б*, что и при старении фермента. Быстрый переход цепи *А* в цепь *В* при действии Т заставляет полагать, что цепь *В* в свежевыделенной КО (20%) является результатом частичного протеолиза, который может происходить еще в молоке или при выделении и очистке фермента. Изменение картины диссоциации при хранении фермента является, по-видимому, следствием дальнейшего протеолиза КО.

Так как молекулярный вес КО составляет примерно 300 000 ^(2, 6), а свежевыделенные образцы диссоциируют в ДСН в основном на полипептидные цепи с м.в. 150 000, то можно сделать вывод, что КО построена из двух полипептидных цепей (цепи *А*). Каждая из этих цепей может образовывать несколько глобул, соединенных между собой небольшими «петлями» полипептидной цепи, легко доступными для протеолиза.образова-

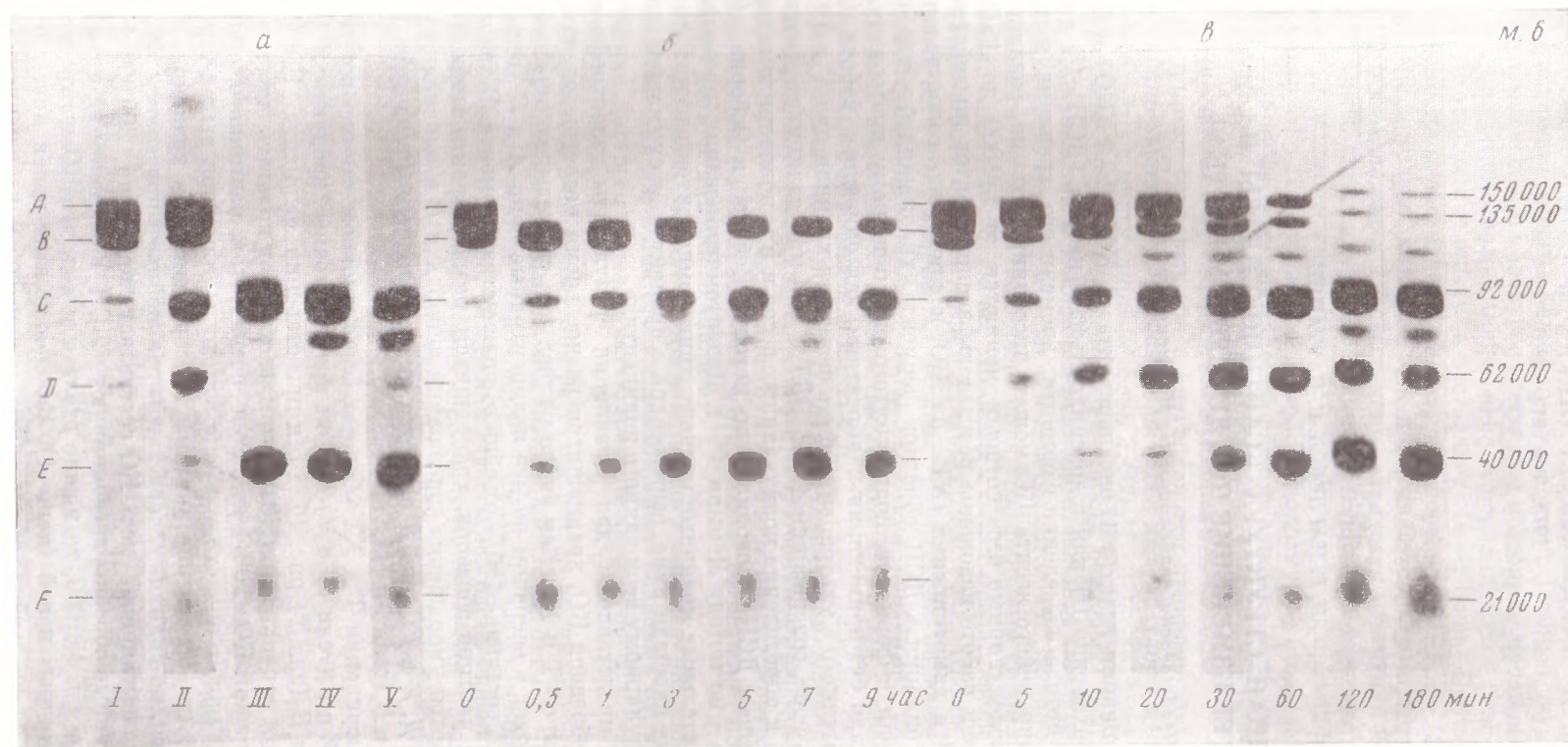


Рис. 1. *a* — электрофоретическая картина диссоциации КО в ДСН. I — свежевыделенный фермент; II и III — образцы фермента, хранившиеся 4 мес. и 1 год, соответственно; IV и V — образцы фермента, обработанного в течение 24 час. Т и ХТ, соответственно; *b* — кинетика протеолиза КО ХТ; А — F — см. в тексте

ние нескольких глобул, соединенных короткими участками цепи, является, по-видимому, характерным для очень длинных полипептидных цепей (7).

Рассмотрим более подробно кинетику ограниченного протеолиза КО под действием Т и ХТ (рис. 16, в и 2).

При переваривании Т наблюдается быстрый переход цепей А в цепи В (рис. 16). Дальнейшее

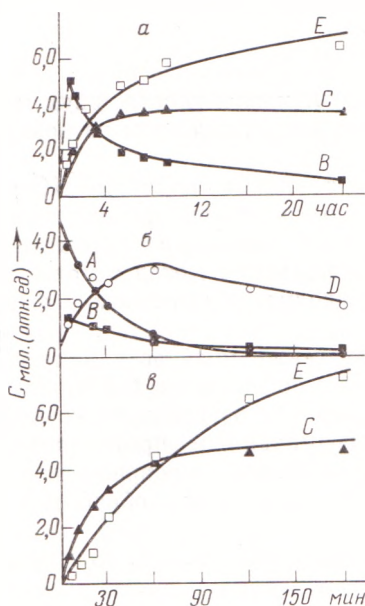


Рис. 2

Рис. 2. Изменение относительных молярных концентраций полипептидных цепей в зависимости от времени инкубации с Т (а) и ХТ (б и в). Значки на кривых — экспериментальные данные. Для цепей В и С (а) кривые рассчитаны по схеме (1), для цепей А, D и С (б, в) — по схеме (2). Кривые для цепи Е рассчитаны из уравнения баланса

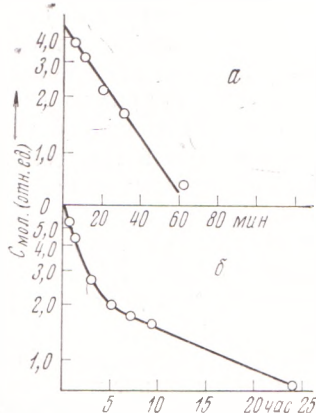


Рис. 3

Рис. 3. Полулогарифмический график изменения относительной молярной концентрации цепи А от времени инкубации с ХТ (а) и цепи В от времени инкубации с Т (б)

переваривание цепей В не подчиняется уравнению первого порядка (рис. 3б).

Кинетическая кривая распада В может быть описана суммой двух экспонент $B = B_{01}e^{-k_1 t} + B_{02}e^{-k_2 t}$ с $k_1 = 9,2 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$ и $k_2 = 8,3 \cdot 10^{-4} \text{ мин}^{-1}$; $B_{01} = 3,7$, $B_{02} = 2,5$.

Если принять, что протеолиз Т протекает по схеме

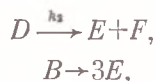


то наблюдается хорошее соответствие расчетных кривых с экспериментом (рис. 2а).

Кинетика протеолиза ХТ (рис. 16, 2б, в) отличается от кинетики протеолиза Т.

Хорошее совпадение расчетных кривых с экспериментом наблюдается для следующей схемы протеолиза ХТ





где $k_1 = 3,2 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$, $k_2 = 5,4 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$.

Наблюдаемая двухкомпонентная кинетика протеолиза цепей *B* трипсином в совокупности с данными ^(8, 9) по неэквивалентности двух молекул ФАД, входящих в молекулу КО, может служить указанием на возможную неэквивалентность цепей в КО.

Чувствительность к протеолизу делает трудным получение КО с неизменной четвертичной структурой. Однако, частичный протеолиз не вызывает существенного изменения активности фермента по отношению к ксантину. Для выделения КО широко используют метод с применением панкреатина, например ⁽¹⁰⁾, который приводит к активному ферменту с измененной структурой ^(1, 2).

Ограниченный протеолиз представляет также интерес как метод исследования динамической структуры и роли кофакторов в КО. Так, для ксантиндегидрогеназы из печени крысы переход из дегидрогеназной формы в оксидазную может быть вызван ограниченным протеолизом ⁽¹¹⁾, с другой стороны КО из молока теряет способность превращаться в дегидрогеназу при действии 10 мМ дитиотрептола после обработки химо-трипсином ⁽¹²⁾.

Авторы выражают благодарность академику Н. М. Эмануэлю за постоянный интерес к работе.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
23 V 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. А. Nelson, P. Handler, J. Biol. Chem., **243**, 5368 (1968). ² Л. Г. Харлер, Л. С. Варганян, Биохимия, **38**, № 3 (1973). ³ K. Weber, M. Osborn, J. Biol. Chem., **244**, 4406 (1969). ⁴ U. K. Laemmli, Nature, **227**, 680 (1970). ⁵ J. King, U. K. Laemmli, J. Mol. Biol., **62**, 465 (1971). ⁶ P. Andrews, R. C. Bray et al., Biochem. J., **93**, 627 (1964). ⁷ R. E. Gates, H. S. Fisher, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **68**, 2928 (1971). ⁸ M. Kanda, F. O. Brady et al., J. Biol. Chem., **247**, 765 (1972). ⁹ M. Kanda, K. V. Rajagopalan, J. Biol. Chem., **247**, 2177 (1972). ¹⁰ L. J. Hart, M. A. McGartol et al., Biochem. J., **116**, 851 (1970). ¹¹ F. Stirpe, E. Della Corte, J. Biol. Chem., **244**, 3855 (1969). ¹² M. G. Batelli, E. Lorenzoni, F. Stirpe, Biochem. J., **131**, 191 (1973).