

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 ксантино-О-оксидоредуктазы, КФ 1.2.3.2 (КО) в 6 M гуанидингидрохлориде <sup>(1)</sup> или в додецилсульфате натрия (ДСН) <sup>(2)</sup> 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 <sup>(2)</sup>. Образцы гомогенного в ультракентрифуге фермента хранили при 4° в 0,1 M фосфатном буфере, содержащем 1 mM ЭДТА и 1 mM салицилат натрия. Электрофорез и определение молекулярных весов по 5% полиакриламидном геле, содержащем ДСН, проводили по методу Вебера и Осборна <sup>(3)</sup>, а в 10% геле — по методу Леммли <sup>(4, 5)</sup>. Денситометрирование проводили по <sup>(2)</sup>. 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 A и B (гель I), причем цепь A составляет 80% от общего количества фермента. В электрофоретической картине образцов, хранившихся разное время (гели II и III), наблюдается уменьшение содержания цепей A и B и накопление новых цепей C, D, E и F; цепь D является промежуточным продуктом распада цепей A и B (гели I и II).

При переваривании Т и ХТ образуются в основном те же конечные продукты C, E и F (гели IV и V) и те же промежуточные продукты D (для ХТ) рис. 1в и B (для Т) рис. 1б, что и при старении фермента. Быстрый переход цепи A в цепь B при действии Т заставляет полагать, что цепь B 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 <sup>(2, 6)</sup>, 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 A). Каждая из этих цепей может образовывать несколько глобул, соединенных между собой небольшими «петлями» полипептидной цепи, легко доступными для протеолиза. Образова-

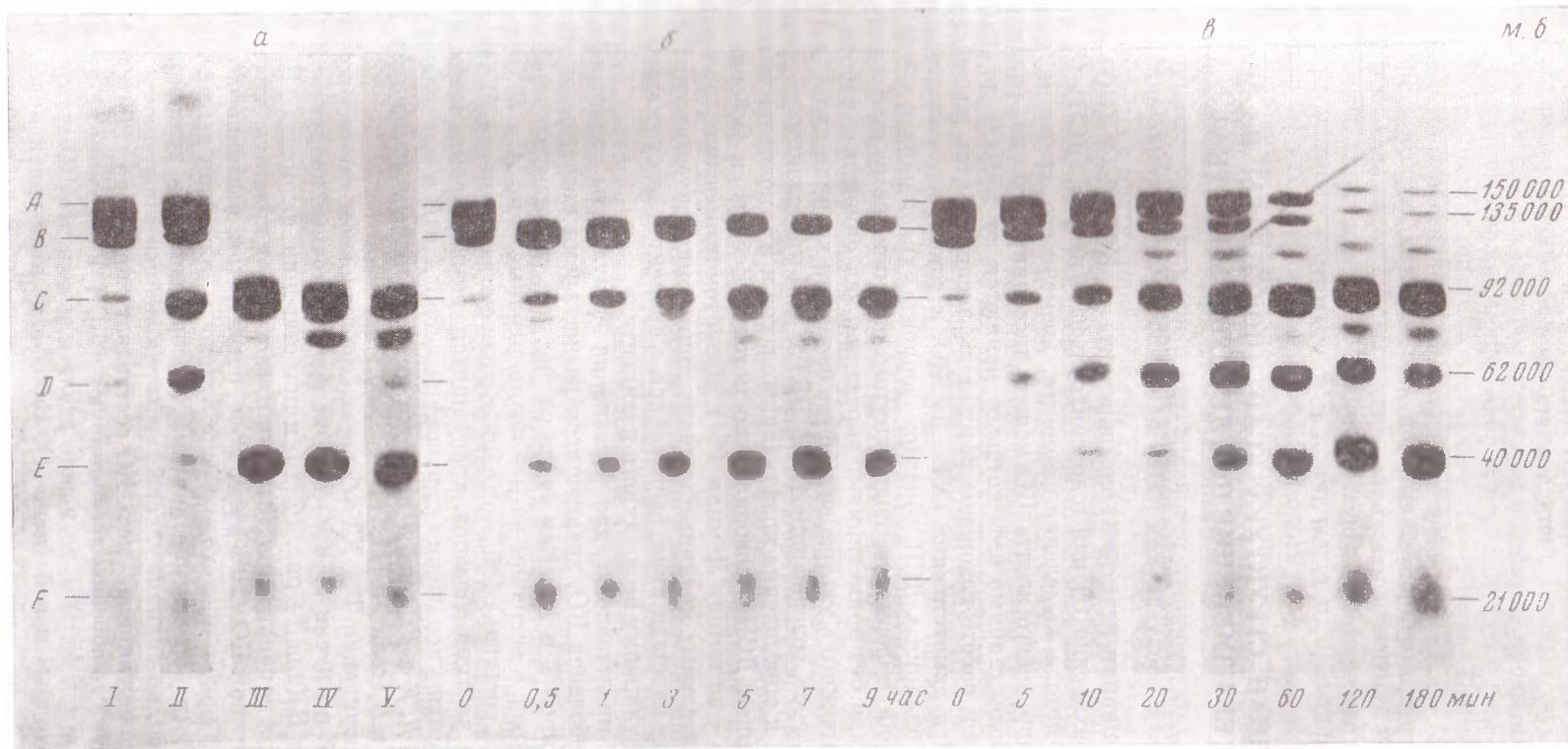


Рис. 1. *a* – электрофоретическая картина диссоциации KО в ДСН. *I* – свежевыделенный фермент; *II* и *III* – образцы фермента, хранившиеся 4 мес. и 1 год, соответственно; *IV* и *V* – образцы фермента, обработанного в течение 24 час. Т и ХТ, соответственно; *b* – кинетика протеолиза KО Т; *c* – кинетика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

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

Рассмотрим более подробно кинетику ограниченного протеолиза КО под действием Т и ХТ (рис. 1б, в и 2).

При переваривании Т наблюдается быстрый переход цепей А в цепи В (рис. 1б). Дальнейшее

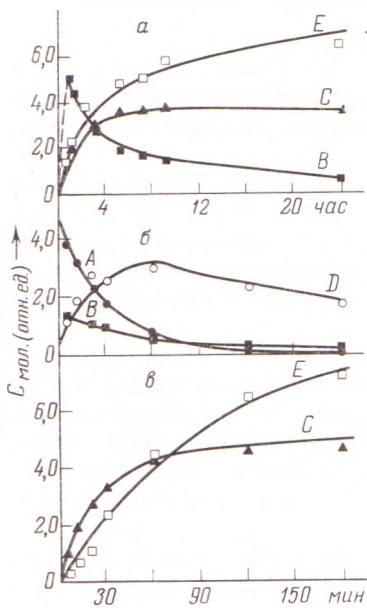


Рис. 2

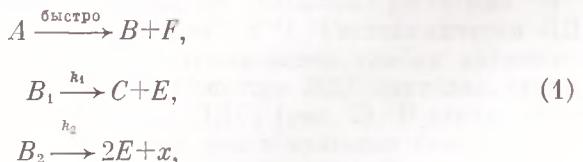
Рис. 2. Изменение относительных молярных концентраций полипептидных цепей в зависимости от времени инкубации с Т (а) и ХТ (б и в). Значки на кривых — экспериментальные данные. Для цепей В и С (а) кривые рассчитаны по схеме (1), для цепей А, Д и С (б, в) — по схеме (2). Кривые для цепи Е рассчитаны из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

Рис. 3. Полулогарифмический график изменения относительной полярной 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  $k_1 = 9,2 \cdot 10^{-3}$  мин<sup>-1</sup> и  $k_2 = 8,3 \cdot 10^{-4}$  мин<sup>-1</sup>;  $B_{01} = 3,7$ ,  $B_{02} = 2,5$ .

Если принять, что протеолиз Т протекает по схеме

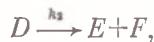


то наблюдается хорошее соответствие расчетных кривых с экспериментом (рис. 2а).

Кинетика протеолиза ХТ (рис. 1б, 2б, в) отличается от кинетики протеолиза Т.

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





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

Наблюдаемая двухкомпонентная кинетика протеолиза цепей  $B$  трипсином в совокупности с данными <sup>(8, 9)</sup> 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 неизмененной 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 <sup>(10)</sup>, который приводит к активному ферменту с измененной структурой <sup>(1, 2)</sup>.

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 <sup>(11)</sup>, с другой стороны КО из молока теряет способность превращаться в дегидрогеназу при действии 10 mM дитиотреントола после обработки химотрипсином <sup>(12)</sup>.

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

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