

УДК 577.1 + 577.153.36

БИОХИМИЯ

В. В. РЫБИНА, Г. П. МИРОНОВ, Е. П. ЧЕТВЕРИКОВА

ДИСУЛЬФИДНЫЕ СВЯЗИ И СУЛЬФИДРИЛЬНЫЕ ГРУППЫ  
МЫШЕЧНОЙ КРЕАТИНКИНАЗЫ

(Представлено академиком С. Е. Севериным 16 XI 1970)

О существовании дисульфидных связей в молекуле креатинкиназы можно было судить только на основании косвенных данных, сопоставляя литературные данные о содержании цистеина, полученные при аминокислотном анализе, с количеством свободных сульфгидрильных групп. Согласно аминокислотному анализу в молекуле фермента содержится 8 остатков цистеина (1, 2). Данные содержания сульфгидрильных групп в креатинкиназе неоднозначны. В первых работах в денатурированном 8 M мочевиной белке найдено 6,4 SH-группы на молекулу белка (3), что предполагает наличие одной дисульфидной связи (4). В последних исследованиях в денатурированном ферменте обнаружено 8 SH-групп на 1 моль (5), что указывает на отсутствие SS-связей.

В настоящей работе определялось содержание дисульфидных связей в креатинкиназе различными методами.

Гомогенный препарат креатинкиназы с высокой величиной ферментативной активности выделяли по ранее описанному методу (6). Концентрацию белка определяли микробиуретановым методом (7), использовали в качестве стандартов рибонуклеазу фирмы Реанал и восстановленный глутатион фирмы Мерк. Мочевину, гуанидингидрохлорид,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  дважды перекристаллизовывали и соли пропускали через колонку с катионитом Дауэкс-50. Содержание сульфгидрильных групп в белках определяли амперометрическим титрованием по Кольтгофу (8) и флуорометрическим методом (9, 10). В последнем случае измеряли тушение флуоресценции флуоресценмеркуриацетата SH-группами в области 520 мк при pH 7,4.

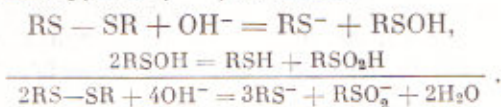
Содержание дисульфидных связей определяли тремя методами.

1. Обратным титрованием SH-групп, образовавшихся после щелочного гидролиза дисульфидных связей. Белок гидролизали 1 N NaOH в присутствии известного количества ионов серебра, которые связывают свободные и образующиеся из дисульфидных связей SH-группы и предохраняют их от окисления. После гидролиза раствор нейтрализовали  $\text{HNO}_3$ , добавляли восстановленный глутатион для связывания непрореагировавшего серебра и оставшийся глутатион оттитровывали по Кольтгофу. Количество SS-связей вычисляли по разности между содержанием SH-групп в белке после гидролиза и содержанием SH-групп после денатурации белка в 8 M мочевины.

2. Обратным титрованием SH-групп, образовавшихся после обработки белка  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  в присутствии 4 M гуанидингидрохлорида и избытка ионов  $\text{Ag}^+$ . Титрование проводили так же, как после щелочного гидролиза. В контрольную пробу вместо  $6,5 \cdot 10^{-2}$  M  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  добавляли  $6,5 \cdot 10^{-2}$  M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (II).

3. Флуорометрическим методом после связывания сульфгидрильных групп моноiodоксусной кислотой. Определение проводили при pH 14,0 по тушению флуоресценции флуоресценмеркуриацетата (9, 10).

При щелочном гидролизе из двух дисульфидных связей образуются три сульфгидрильные группы (<sup>13-14</sup>) по схеме:



Кинетика щелочного гидролиза дисульфидных связей была исследована на рибонуклеазе — белке, в котором известно содержание SS-связей. Оказалось, что SS-связи разрываются быстро и за 15 мин. гидролизуются полностью. После некоторого плато происходит потеря сульфгидрильных групп, несмотря на присутствие ионов  $\text{Ag}^+$  (рис. 1, 1). Из данных титрования после 15 и 30 мин. гидролиза было получено 4 SS-группы на молекулу белка (табл. 1), что соответствует литературным данным (<sup>15, 16</sup>).

В разных препаратах нативной креатинкиназы нами было обнаружено от 6 до 7 SH-групп на молекулу белка (расчет на молекулярный вес 81000). В нативной креатинкиназе, выделенной из мышц (<sup>17</sup>), амперометрическим титрованием, обнаруживается две SH-группы (<sup>5</sup>). Различие в содержании доступных для ионов серебра SH-групп указывает на разную конформацию креатинкиназы, полученных разными методами (<sup>6, 17</sup>).

После денатурации 8 M мочевиной в наших опытах в креатинкиназе появлялась еще одна или две сульфгидрильные группы (табл. 1). После щелочного гидролиза креатинкиназы наблюдается прирост SH-групп, но он происходит гораздо медленнее, чем в случае рибонуклеазы (рис. 1). К полутора-двум часам гидролиза прирост достигает максимума и затем наблюдается потеря сульфгидрильных групп. Максимальный прирост сульфгидрильных групп соответствует 1,9 дисульфидным связям на молекулу креатинкиназы (табл. 1). Следует отметить, что в сильнощелочной среде происходит только разрыв связей —S—S—, но не —C—S— метионина (<sup>18</sup>).

После обработки белка сульфитом натрия обнаружить дисульфидные связи в креатинкиназе не удалось даже за 50 мин. восстановления (табл. 2), хотя обычно достаточно более коротких сроков. С течением времени наблюдалась только некоторая потеря SH-групп, совершенно одинаковая в пробах с сульфитом и без него. Этим же методом в РНКазе можно было определить SS-связи.

Данные флуорометрического определения сульфгидрильных групп и дисульфидных связей в креатинкиназе приведены в табл. 3, из которой можно видеть, что этим методом в креатинкиназе определяется около трех дисульфидных связей на 1 моль.

Двумя методами (амперометрическим титрованием денатурированного белка и флуорометрическим) была получена величина 8 SH-групп на 1 моль креатинкиназы (табл. 1—3), причем результаты определений на разных препаратах хорошо совпадали. Полученная величина совпала с данными (<sup>5</sup>). Определение содержания дисульфидных связей в белках представляет собой значительно более сложную задачу, и разные методы не дали в этом случае хорошего совпадения (максимально 1,9 SS-связи после щелочного гидролиза и 2,7 флуорометрическим методом). Дисульфидные связи креатинкиназы гидролизуются с трудом, для гидролиза требуется длительный срок, до двух часов. Возможно, что частичное раз-

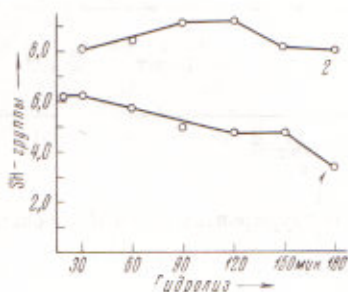


Рис. 1. Зависимость числа образующихся SH-групп на 1 моль белка от времени щелочного гидролиза для рибонуклеазы (1) и креатинкиназы (2).

рушение SH-групп начинается, как и в рибонуклеазе, через 30 мин. гидролиза и за счет этого получаются заниженные величины содержания дисульфидных связей в креатинкиназе. О трудности расщепления SS-связей в креатинкиназе свидетельствует также отрицательный результат с восстановлением их сульфатом натрия в денатурированном белке.

Таблица 1

Число SH-групп до и после щелочного гидролиза в рибонуклеазе и креатинкиназе на 1 моль белка

Белок	Креатинкиназа			Рибонуклеаза
	II 1970	IV 1970	V 1970	
Нативный				
I*	5,93	6,50	6,00	0
II	7,02	6,54	6,00	
Денатурированный в 8M мочевице				
I	7,70	6,80	—	
II	7,68 ± 0,17 (6)	7,36 ± 0,19 (22)	7,95 ± 0,20 (4)	0
После щелочного гидролиза				
I	10,4	9,7	—	
II	9,91 ± 0,29 (2)	9,07 ± 0,17 (24)	9,49 ± 0,25 (4)	6,26 ± 0,50 (8)
Число SS-связей на 1 моль белка				
I	1,80	1,90	—	—
II	1,49	1,14	1,03	4,17

\* I — белок непосредственно после выделения, II — белок после хранения, в скобках — число определений.

Из данных, полученных двумя методами, основанными на совершенно разных принципах (тушение флуоресценции дисульфидной связью и учет SH-групп, образовавшихся после гидролиза SS-связи), можно сделать

Таблица 2

Количество SH-групп в креатинкиназе до и после обработки белка сульфитом натрия

Время, мин.	Контрольные пробы	Пробы с Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>
1	7,85	7,85
5	7,40	7,35
10	7,25	7,25
50	6,68	6,69

Таблица 3

Содержание SH-групп и SS-связей в молекуле креатинкиназы, определенное флуорометрическим методом

Дата выделения белка	Сульфгидрильные группы	Дисульфидные связи	Число определенных
V 1970	8,2	2,6	6
V 1969	8,0	2,8	5
V 1969	7,9	2,7	6

заключение, что креатинкиназа содержит не менее двух дисульфидных связей, а следовательно, и не менее 12 цистеиновых остатков в молекуле. Можно отметить, что определение содержания дисульфидных связей амперометрическим титрованием после щелочного гидролиза в белках является простым и удобным методом и дает четкие результаты, в особенности, если белок не содержит свободных сульфгидрильных групп (например, РНКазы).

Институт биофизики  
Академии наук СССР  
Пушкино-на-Оке

Поступило  
14 XI 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> R. H. Yue, R. H. Palmieri et al., *Biochemistry*, **6**, 3204 (1967). <sup>2</sup> E. A. Noltmann, T. A. Mahowald, S. A. Kuby, *J. Biol. Chem.*, **237**, 1146 (1962). <sup>3</sup> R. E. Venesh, H. Lardy, R. Venesh, *J. Biol. Chem.*, **216**, 663 (1955). <sup>4</sup> S. A. Kuby, E. A. Noltmann, In: *The Enzymes*, **6**, 1962, p. 515. <sup>5</sup> P. M. Bailey, A. V. Tompson, *Biochem. J.*, **104**, 33 (1967). <sup>6</sup> Е. П. Четверикова, А. В. Крипская и др., В сборн. Свойства и функции макромолекулярных систем и макромолекул, 1969, «Наука», стр. 110. <sup>7</sup> R. F. Itzhaki, D. M. Gill, *Anal. Biochem.*, **9**, 401 (1964). <sup>8</sup> M. Kolthoff, W. E. Harris, *Indust. Eng. Chem.*, **18**, 161 (1946). <sup>9</sup> Б. А. Король, М. А. Таршис и др., *Радиобиология*, № 4, 491 (1970). <sup>10</sup> Г. П. Миронов, Ю. Г. Каминский, М. Н. Кондрашова, *Вопр. мед. хим.*, **17**, в. 1, 83 (1971). <sup>11</sup> J. Carter, *J. Biol. Chem.*, **234**, 1705 (1959). <sup>12</sup> F. Challenger, A. A. Rawlings, *J. Chem. Soc.*, **1937**, 868. <sup>13</sup> Ю. М. Торчинский, В сборн. Ферменты, «Наука», 1964, стр. 124. <sup>14</sup> M. Wronski, *Monatsh. Chem.*, **94**, 197 (1963). <sup>15</sup> H. Resnick, I. R. Carter, G. Kalnitsky, *J. Biol. Chem.*, **234**, 1711 (1959). <sup>16</sup> J. Leggett, *Techniques in Protein Chem.*, 1962, p. 107. <sup>17</sup> S. A. Kuby, I. Noda, H. Lardy, *J. Biol. Chem.*, **209**, 191 (1954). <sup>18</sup> F. Karush, N. R. Klinman, R. Marks, *Anal. Biochem.*, **9**, № 1 (1964).