

З. С. ГЕРШЕНОВИЧ, А. А. КРИЧЕВСКАЯ, А. И. ЛУКАШ

ОСОБЕННОСТИ КОМПЛЕКСОВ МОЧЕВИНЫ С БЕЛКАМИ

(Представлено академиком А. И. Опариным 9 III 1971)

Мочевина возникла абиогенно на определенном этапе органохимической эволюции и могла участвовать, взаимодействуя с биополимерами, в формировании предбиологических, а затем и биологических систем. Физико-химические свойства молекул мочевины допускают разные способы ее взаимодействия с белками (¹, ²). Мочевина является облигатным компонентом всех тканей животных, а также многих растений и микроорганизмов. Низкие концентрации мочевины влияют на физико-химические свойства белков (³), на активность ферментов (⁴, ⁵). Показан защитный эффект мочевины при гипероксии (⁶), гипотермии, ожоговом шоке (⁷), лучевом поражении (⁸). Подавляющее большинство работ, характеризующих взаимодействие мочевины с биополимерами, проведено с высокими, денатурирующими концентрациями мочевины. Однако комплексообразование мочевины с белками значительно зависит от ее концентрации (⁹).

В связи с этим мы поставили своей целью исследовать в модельных системах характер комплексообразования белков с мочевиной при ее физиологических концентрациях. Исследовали связывание мочевины с 14 препаратами кристаллических или лиофилизированных белков отечественного и зарубежного производства. О связывании мочевины судили по разнице в равновесном ее распределении между внутренним и внешним объемами декстрановых гелей (Сефадекс Г-25 или Молселект Г-25, тонкие фракции) в присутствии и в отсутствие белка во внешнем объеме. Аналогичным методом исследовано связывание РНКазы с нуклеотидами (¹⁰). Пробы содержали 0,75 г декстранового геля, набухшего в 0,05 М фосфатном буфере рН 7. К ним прибавляли 1,5 мл буфера, содержащего в опытных пробах 0,5 или 1 ммол. белка и мочевины, в контроле — только мочевины. Средняя концентрация мочевины в пробах составляла 3,3 ммол. на 1 мл буфера. Для установления равновесия пробы инкубировали 60 мин. (время определено экспериментально) при 20°, периодически встряхивая. Из части внешнего объема, полученного фильтрованием через стеклянный фильтр или осторожным отсасыванием надосадочной жидкости, белки осаждали 10% ТХУ. В безбелковом центрифугате определяли содержание мочевины с диацетилмонооксимовым реактивом. Контрольные пробы обрабатывали аналогично. Препараты белков контролировали также на содержание низомолекулярных веществ, мешающих определению мочевины. Учитывая возможность частичной адсорбции белков гелем, их концентрацию в свободном объеме определяли по у.-ф. поглощению при 280 мμ.

Результаты представлены в табл. 1, из которой следует, что связывающая способность белков, состоящих из одной полипептидной цепи (№№ 1—7), за исключением трипсина, приблизительно одинакова и лежит в пределах 1,29—1,78 мол. мочевины на 1 моль белка. Следствием этого является обратная зависимость между связывающей способностью и молекулярным весом белка при расчете в ммольях на 100 мг белка. Белки, обладающие четвертичной структурой (№№ 9—13), а также трипсин и химотрипсин характеризуются более высокой способностью к комплексообразованию с мочевиной. Сравнение известных данных по аминокислотному составу

Связывание белков с мочевиной (0,05 М фосфатный буфер рН 7, 20°,
инкубация 60 мин.)

№	Белки	Связанная мочевина		№	Белки	Связанная мочевина	
		мол/мол белка	мол. на 100 мг белка			мол/мол белка	мол. на 100 мг белка
1	Цитохром С	1,29±0,07	10,4	8	Трипсин	3,0±0,21	12,6
2	РНКаза	1,26±0,05	9,2	9	α-Химотрипсин	2,28±0,15	9,58
3	Лизоцим	1,30±0,09	8,9	10	Каталаза	2,16±0,09	0,92
4	Пероксидаза	1,32±0,21	3,3	11	β-Амилаза	2,91±0,14	1,92
5	Овальбумин	1,78±0,09	3,8	12	Гемоглобин	2,06±0,11	3,02
6	Альбумин сыворотки человека	1,45±0,07	2,23	13	Гексокиназа	4,1±0,37	4,1
7	Альбумин сыворотки быка	1,50±0,09	2,25	14	Аргиназа	4,91±0,08	4,1

изученных препаратов белков не позволило отнести «центры связывания» мочевины к определенным аминокислотным остаткам. Представленные данные свидетельствуют об участии концов полипептидных цепей во взаимодействии с мочевиной. Один из концов, видимо карбоксильный, обладает преимущественной способностью к ассоциации. Нецелочисленные значения молекулярных соотношений в комплексах могут быть следствием наличия дополнительных «центров связывания» или некоторой деструкцией белков. Повышенная ассоциация эндопептидаз с мочевиной, очевидно, связана в случае трипсина с автолизом⁽¹¹⁾, а для α-химотрипсина — со специфической деструкцией полипептидной цепи при его возникновении из неактивного предшественника.

Подтверждением предположения об участии концов полипептидных цепей в комплексировании с мочевиной служило нарастание связывающей способности сывороточного альбумина при его обработке трипсином (8 мкг на 1 мг субстрата). 20-минутная обработка увеличивала связывание на 35%, инкубация в течение 40 мин. — на 107%. В исследованных белках с четвертичной структурой (№№ 9—13) связывающая способность, видимо, определяется ее особенностями, степенью доступности «центров связывания» для мочевины.

Существуют представления⁽²⁾, что при денатурирующих концентрациях мочевины комплексируется посредством образования двух «полифункциональных» водородных связей с пептидными группами белков. Это подтверждает наше предположение, что при физиологических концентрациях наиболее вероятно комплексообразование мочевины с концами полипептидных цепей, которые в нативных белках обладают дополнительными возможностями для образования водородных связей.

Ростовский государственный
университет

Поступило
3 III 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. Collaccio, Nature, 192, 4880, 584 (1963). ² Dr. Robinson, W. P. Jencks, J. Am. Chem. Soc., 87, 11, 2462 (1965). ³ И. М. Спектор, Биофизика, 11, 406 (1966). ⁴ K. V. Rajagoralan, I. Fridovich, Ph. Handler, J. Biol. Chem., 236, 4, 1054 (1961). ⁵ И. Г. Штранкфельд, Биофизика, 15, 1, 22 (1970). ⁶ М. Л. Андреев, В. С. Шугалей, Влияние повышенного давления кислорода на организм, 3, Ростов-на-Дону, 1969. ⁷ Н. Г. Агабегова, А. Я. Векслер, Л. И. Дремова, Материалы XV научн. конфер. физиол. биохим. фармакол. Юга РСФСР, Махачкала, 1965. ⁸ А. М. Кузин, О. А. Буадзе, Радиобиология, 9, 4, 640 (1969). ⁹ J. A. Gordon, J. R. Warren, J. Biol. Chem., 243, 21, 5663 (1968). ¹⁰ P. Fassella et al., Biochim. et biophys. acta, 103, 4, 708 (1965). ¹¹ R. L. Smith, E. Shaw, J. Biol. Chem., 244, 17, 4704 (1969).