

Л. В. БЕЛОУСОВА

СУЛЬФИДРИЛЬНЫЕ ГРУППЫ ДВУХ ФОРМ КРЕАТИНКИНАЗЫ ИЗ ГРУДНОЙ МЫШЦЫ ГОЛУБЯ

(Представлено академиком С. Е. Севериным 17 I 1972)

Креатинкиназа (КК) (2.7.3.2) относится к числу сульфгидрильных ферментов. Согласно гипотезе Уотса и Ребина, механизм каталитического действия фермента основан на наличии в активном центре тиол-имидазольной группы, соединенной водородной связью (¹). В настоящее время роль имидазольного кольца гистидина, а также SH-групп в механизме действия КК интенсивно изучается и обсуждается (²⁻³).

Аминокислотным анализом для КК из мышц кролика находят 8 остатков цистеина на 1 моль фермента (^{6, 7}). Из них 2 SH-группы особенно реактивны, с ними связывается ферментативная активность белка (⁷⁻⁹). Они легко титруются с 5,5-дитиобис-2-нитробензойной кислотой (ДТНБ) (¹⁰⁻¹¹) и амперометрическим титрованием (¹²). В ферменте, денатурированном 8 М мочевиной, открываются еще 4—5 SH-групп (¹⁰⁻¹²). Данные о количестве SH-групп КК и их реакционной способности очень противоречивы. Имеется сообщение, что разные изоформы КК обладают различным количеством и разной реакционной способностью титруемых SH-групп (¹¹).

Настоящая работа посвящена изучению сульфгидрильных групп двух форм КК из грудной мышцы голубя.

Креатинкиназу выделяли методом Кьюби (¹³) в модификации Четвериковой (⁴). Из грудных мышц голубя фермент выделяли этим методом в неомогенном состоянии. Поэтому на последнем этапе выделения нами была введена дополнительная стадия очистки фермента с помощью хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе в 0,05 М трис-НСl-буфере pH 8,6. Проводили ступенчатую элюцию тем же буферным раствором и нарастающими концентрациями KCl. Подбор условий элюирования позволил выделить две фракции белка, которые обладали креатинкиназной активностью. Первая фракция (креатинкиназа I) получена при элюции только 0,05 М трис-НСl-буфером pH 8,6, вторая фракция (креатинкиназа II) — при добавлении к буферу 0,03 М KCl. Активность креатинкиназы I (КК I) 60—90 ед. на 1 мг белка, активность креатинкиназы II (КК II) 20—40 ед. на 1 мг белка. За единицу энзиматической активности принимали условную единицу, предложенную Кьюби (¹³). Обе формы фермента гомогенны при седиментационном анализе в ультрацентрифуге типа «Спинко Бекмана Е» и имеют одинаковый коэффициент седиментации ~5 S. При электрофорезе в агаровом и полиакриламидном гелях в обеих формах креатинкиназы не было обнаружено белков, не обладающих креатинкиназной активностью. При диск-электрофорезе в полиакриламидном геле в трис-глициновом буфере pH 8,3 креатинкиназа II проявляет несколько большую подвижность, чем креатинкиназа I.

Определение количества сульфгидрильных групп проводили спектрофотометрически по методу Элмана (¹⁴) с 5,5-дитиобис-2-нитробензойной кислотой (ДТНБ) и амперометрическим титрованием (¹⁵).

При взаимодействии белка с ДТНБ образующийся окрашенный анион тионитрофенилата измеряли спектрофотометрически по приросту поглощения при 420 мμ ($E_n = 13600$).

В кювете спектрофотометра инкубировали 3 мл раствора креатинкиназы (0,35—0,83 мг/мл при pH 8,6) с 0,05 мл $2 \cdot 10^{-2}$ M раствора ДТНБ.

Амперометрическое титрование сульфгидрильных групп достигалось 10^{-4} M — 10^{-5} M растворами AgNO_3 при pH 7,8—8,0 в 0,25 M трис-буфере в присутствии 0,02 M KCl. На пробу брали 2—3 мг фермента.

Содержание белка в пробах определяли методом Лоури и спектрофотометрически. Количество SH-групп рассчитывали на молекулярный вес фермента, равный 81 000.

Ультрацентрифугирование проводили в лаборатории седиментационного анализа на ультрацентрифуге типа «Интела». Расчет коэффициента седиментации фермента в 8 M мочевины проводили с учетом поправки на плотность и вязкость мочевины (¹⁶, ¹⁷). Мочевину перекристаллизовывали из метанола.

Две формы КК из грудных мышц голубя в нативном состоянии различаются количеством быстро реагирующих SH-групп на 1 моль белка: при спектрофотометрическом титровании ДТНБ pH 8,6 в креатинкиназе I 1,9—2,2 (5) *, в креатинкиназе II 0,9—1,0 (6); при амперометрическом титровании AgNO_3 pH 8,0 соответственно 1,6—2,2 (7) и 0,3—0,4 (5).

Спектрофотометрически с ДТНБ в КК I титруются 2 SH-группы, в КК II 1 SH-группа. Амперометрически в КК II также титруется меньшее количество SH-групп, чем в КК I. Двумя методами мы обнаруживаем в нативной КК I около 2 быстро реагирующих SH-групп. В КК II с ДТНБ обнаруживается только одна SH-группа. Несколько меньшее количество SH-групп, определяемое в КК II амперометрически (0,4 SH-группы на 1 моль белка) объясняется, вероятно, окислением части SH-групп кислородом воздуха при медленном титровании SH-групп ионами Ag^+ . В КК I SH-группы более устойчивы к окислению их кислородом воздуха, и амперометрически определяется такое же количество SH-групп, что и при быстром методе выявления SH-групп с ДТНБ. Различия в количестве и устойчивости быстро реагирующих SH-групп указывают на разное строение двух форм КК. Наличием только одной такой SH-группы, возможно, объясняется меньшая (в 2—3 раза) активность КК II по сравнению с КК I.

После обработки 8 M мочевиной в двух формах КК открываются еще 4—5 сульфгидрильных групп. В денатурированном состоянии в обеих формах КК обнаруживается приблизительно одинаковое число SH-групп на 1 моль белка (около 6): при спектрофотометрическом титровании ДТНБ pH 8,6 в креатинкиназе I 6,2—6,6 (7), в креатинкиназе II 5,5 (6); при амперометрическом титровании AgNO_3 pH 8,0 соответственно 5,7 (5) и 5,7 (4).

Однако, выявление SH-групп во времени происходит по-разному (рис. 1). В КК I в течение первых 10 мин. оттитровываются 6,6 SH-группы, в КК II происходит медленное раскрытие SH-групп во времени и только через 2 часа оттитровываются 5,6 SH-группы, и это конечный результат. Вероятно, КК I имеет менее жесткую структуру, чем КК II, и более легко подвергается действию окружающего раствора 8 M мочевины.

Изучение структуры креатинкиназы методом ультрацентрифугирования показало, что при взаимодействии фермента с мочевиной происходят глубокие изменения в белке.

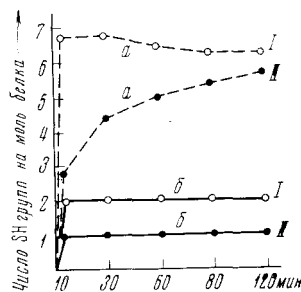


Рис. 1. Титрование SH-групп ДТНБ во времени: а — в креатинкиназе денатурированной 8M мочевиной; б — в нативном ферменте. I — креатинкиназа I, II — креатинкиназа II

* В скобках — количество определений.

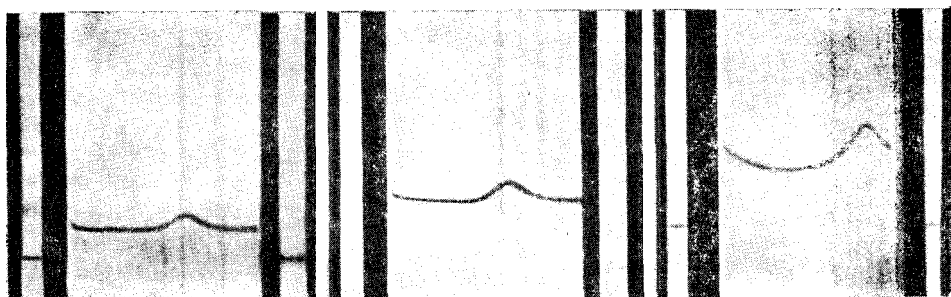


Рис. 2. Седиментограммы креатинкиназы I. а — белок 5 мг/мл + трис 0,05 M pH 8,45, $V = 50740$ об/мин, время съятия кадра 87 мин; б — белок 5 мг/мл + трис 0,05 M pH 8,45 + ДТНБ $0,5 \cdot 10^{-2}$ M, условия те же, что в а; в — белок 5 мг/мл + трис 0,05 M pH 8,45 + мочевиная 8 M, $V = 59780$ об/мин, время съятия кадра 120 мин.

На рис. 2 представлены седиментограммы креатинкиназы I в трех разных условиях: а) нативный фермент в 0,05 M трис-буфере pH 8,45; б) фермент + 0,05 M трис + ДТНБ; в) фермент + 0,05 M трис + 8 M мочевиная.

Коэффициент седиментации нативного фермента равен 4,9 S. Взаимодействие фермента с ДТНБ, при котором происходит блокирование двух существенных SH-групп, не приводит к заметному изменению коэффициента седиментации белка: он равен 4,85 S. При взаимодействии белка с 8 M мочевиной происходит уменьшение коэффициента седиментации до $\sim 2,5$ S, т. е. фермент, вероятно, в этих условиях диссоциирует на субъединицы. Титрование SH-групп ДТНБ в 8 M мочевиной (см. выше) приводит к дополнительному раскрытию еще 4—5 SH-групп на 1 моль белка. Возможно, что эти 4 SH-группы оттитровываются, когда креатинкиназа находится в форме мономера.

Сравнительное изучение сульфгидрильных групп двух форм креатинкиназы из грудных мышц голубя позволило установить различие в количестве быстро реагирующих SH-групп. КК II, обладающая в 2—3 раза меньшей активностью, чем КК I, имеет только одну быстро титруемую SH-группу против двух быстро реагирующих SH-групп в КК I. Изучение SH-групп после денатурации креатинкиназы 8 M мочевиной указывает на разную структурную организацию двух форм креатинкиназы.

Выражаю глубокую благодарность С. Е. Северину за постоянное внимание и интерес к данной работе и Н. П. Мешковой за практическую помощь при выполнении работы и обсуждение результатов.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
7 XII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. C. Watts, B. R. Rabin, Biochem. J., **85**, 507 (1962). ² С. Е. Северин, Усп. совр. биол., **59**, 165 (1965). ³ Е. П. Четверикова, Л. Л. Алиевская, ДАН, **182**, № 6, 1424 (1968). ⁴ Е. П. Четверикова, А. В. Кринская и др., Биохимия, **35**, 5, 953 (1970). ⁵ В. В. Рыбина, Г. П. Миронов, Е. П. Четверикова, ДАН, **199**, № 6, 1446 (1971). ⁶ E. A. Noltmann, T. A. Mahowald, S. A. Kuby, J. Biol. Chem., **237**, 1146 (1962). ⁷ R. H. Yue, R. H. Palmieri et al., Biochemistry, **6**, 3204 (1967). ⁸ D. C. Watts, Nature, **188**, 4757, 1163 (1960). ⁹ D. C. Watts, R. R. Rabin, E. H. Crook, Biochem. biophys. acta, **48**, 380 (1961). ¹⁰ B. T. Hooton, D. C. Watts, Biochem. J., **100**, 637 (1966). ¹¹ B. T. Hooton, Biochemistry, **7**, 2063 (1968). ¹² P. M. Bailey, A. R. Thompson, Biochem. J., **104**, 33 (1967). ¹³ S. A. Kuby, L. Noda, J. Lardy, J. Biol. Chem., **209**, 191 (1954). ¹⁴ G. L. Ellman, Arch. Biochem. and Biophys., **82**, 70 (1959). ¹⁵ R. E. Benesch, R. Benesch, J. Am. Chem., **77**, 5877 (1955). ¹⁶ E. T. Gucher, F. W. Gage, Ch. E. Moser, J. Am. Chem. Soc., **60**, 258 (1938). ¹⁷ K. Kawahara, Ch. Tanford, J. Am. Chem. Soc., **241**, 3228 (1966).