



УДК 577.155.2+543.422.6

РИБОНУКЛЕАЗА *VACILLUS INTERMEDIUS* 7P.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ В РАСТВОРЕ МЕТОДОМ КД

Болотина И. А., Дудкин С. М., Лугаускас В. Ю.,
Хандалия А. Ж.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Лецинская И. Б.

Казанский государственный университет им. В. И. Ульянова-Ленина, Казань

Изучены спектры КД в далекой УФ-области рибонуклеазы *Vac. intermedius* 7P в растворе при различных значениях pH и в присутствии хлоридрата гуанидина. Показано, что экспериментальные спектры фермента в области 205—240 нм хорошо описываются двумя гауссовыми полосами. Одна из них относится к электронным переходам в пептидных группах белка, а вторая к электронным переходам остатков триптофана, состояние которых зависит от степени ионизации остатков тирозина. На основании моделирования первой полосы респерными спектрами КД и соответствующих расчетов сделан вывод, что молекула РНКазы практически не содержит α -спиралей (6%), но содержит значительное количество β -структур (~20%). При этом, несмотря на отсутствие в молекуле белка дисульфидных связей, вторичная структура фермента не изменяется в области значений pH 2,5—11,5. Исследование спектров КД в далекой УФ-области РНКазы в присутствии различных концентраций хлоридрата гуанидина показало, что денатурация фермента является кооперативным процессом и, по-видимому, соответствует модели двух состояний.

Внеклеточная РНКаза *Vac. intermedius* 7P [1] (далее РНКаза) представляет собой интересный объект для исследования связи между первичной структурой белков и их вторичной и третичной структурами*. В молекуле фермента (M12300) отсутствуют серосодержащие аминокислоты, и ее характерной особенностью является относительно высокое содержание остатков ароматических аминокислот: 3 фенилаланина, 7 тирозинов и 3 триптофана. При этом РНКаза обладает высокой устойчивостью к тепловому воздействию в широком диапазоне значений pH.

Для определения вторичной структуры белков в растворе широко применяется метод кругового дихроизма (КД), позволяющий достаточно точно определять процентное содержание α -спиралей и β -структур [2]. Целью нашей работы являлось определение методом КД вторичной структуры РНКазы при различных значениях pH и изучение изменения структуры фермента под действием хлоридрата гуанидина (Gun·HCl).

* Метод препаративного выделения фермента и некоторые его физико-химические характеристики будут опубликованы в статье И. А. Голубенко и др. в № 3 (1979 г.) журнала «Биохимия».

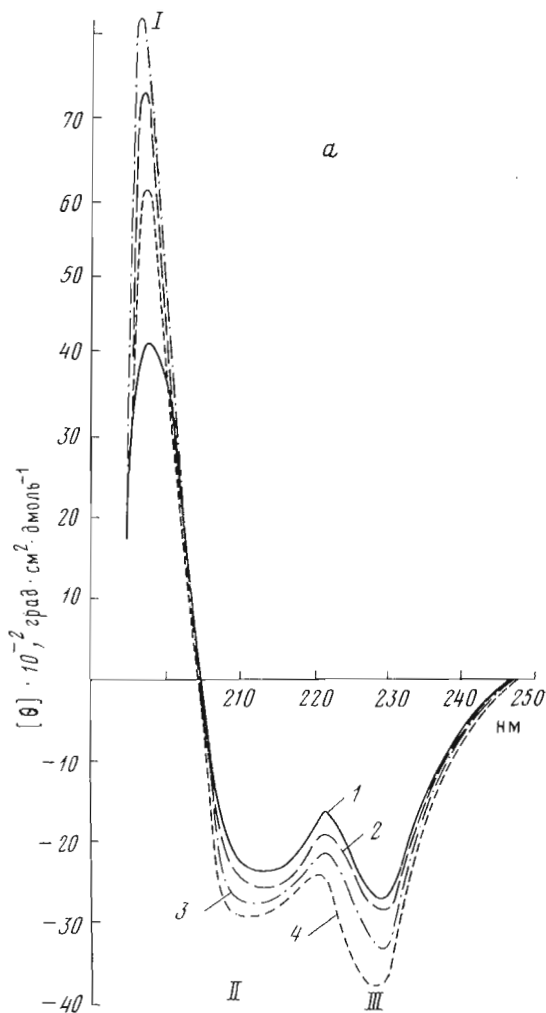


Рис. 1. Спектры КД РНКазы в далекой УФ-области при щелочных (а) и кислых (б) значениях рН в 0,1 М NaCl при 24°. а: 1 — рН 5,35; 2 — 9,52; 3 — 10,50; 4 — 11,50

В спектрах КД РНКазы (рис. 1 а, б) имеются три максимума: два отрицательных при ~ 212 и ~ 230 нм и один положительный при ~ 199 нм. Соотношение сигнал — шум в области положения полосы I очень низкое, и поэтому на спектрах приведены только приближенные значения [0].

Для определения вторичной структуры фермента мы использовали несколько наборов реперных спектров КД различных упорядоченных структур. Были применены спектры КД, полученные Гринфелд и Фасманом [3], Ченом, Янгом и др. [4, 5], а также новые реперные спектры КД для α -спирали, антипараллельной и параллельной β -структур, β -изгибов и неупорядоченной формы, полученные недавно Болотиной и др. [6]. Оказалось, что ни один из примененных наборов реперных спектров достаточно хорошо не описывает наблюдаемый спектр КД РНКазы. Причиной этого является в основном наличие в спектре КД интенсивной отрицательной полосы III при ~ 230 нм. Ранее наличие такой аномальной полосы в спектрах КД было обнаружено для хипотрипсина [7—9], белка Бенс-Джонса [10] и некоторых токсинов [11]. Было выска-

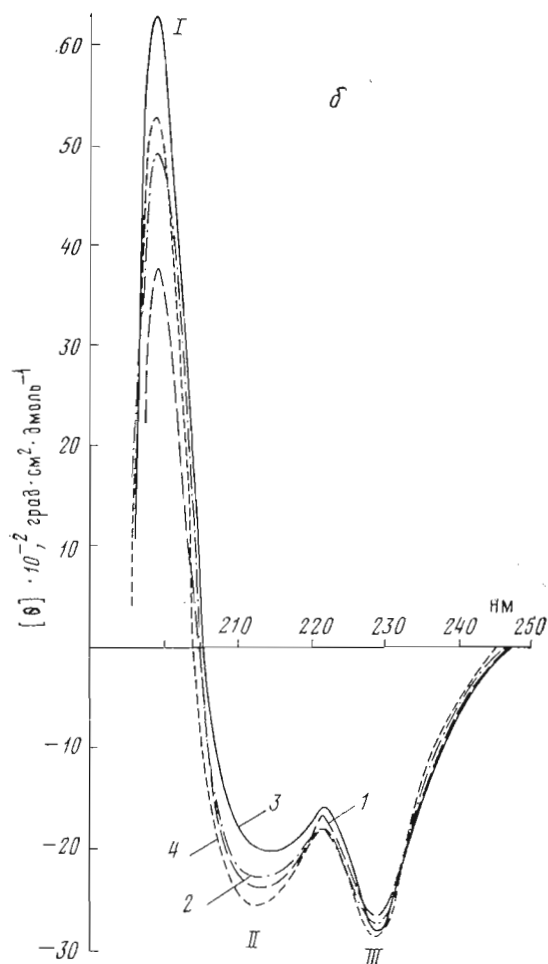


Рис. 16: 1 — рН 5,35; 2 — 4,25; 3 — 3,59; 4 — 2,56

сой II (см. рис. 2). Реперные спектры КД пяти структур [6]: α -спиралей, β -структур (антипараллельной и параллельной) β -изгибов и неупорядоченной формы десколько хуже описывают полосу II РНКазы (дают несколько большее среднеквадратичное отклонение) и имеют следующие значения содержания этих структур: 0,03; 0,10; 0,09; 0,21 и 0,58 соответственно.

Как уже упоминалось выше, полосу КД III при ~ 230 нм следует, по-видимому, отнести к электронным переходам в непептидных группах белка. Поскольку дисульфидные связи в молекуле РНКазы отсутствуют [13], наблюдаемая полоса III может быть отнесена к электронным переходам боковых групп тирозина или триптофана. Для отнесения полосы III

зано предположение, что эта полоса обусловлена электронными переходами в непептидных группах белка. Мы попытались выделить из спектра КД РНКазы в области 205—240 нм эту полосу, а также полосы КД, связанные непосредственно с электронными переходами в пептидных группах. Оказалось, что экспериментальный спектр КД в указанной области достаточно хорошо описывается двумя гауссовыми полосами (рис. 2), характеристики которых представлены в табл. 1.

Полоса II относится, по-видимому, к электронным переходам в пептидных группах белка и описывается наилучшим образом новыми реперными спектрами, полученными в работе [12]. Расчет по этим реперным спектрам дает следующие значения процентного содержания различных структур при рН 5,35: α -спиралей — 6%, β -структуры антипараллельной — 11%, β -структуры параллельной — 10% и неупорядоченной формы — 73%. Теоретический спектр КД, отвечающий указанному процентному содержанию различных структур, хорошо совпадает с выделенной поло-

Таблица 1

Параметры разделенных полос спектра КД РНКазы при рН 5,35

Полоса	λ_0 , нм	$[\theta] \cdot 10^{-2}$, град·см ² ·дмоль ⁻¹	Δ , нм	$R \cdot 10^{12}$ (CCS)
II	213,86	-24,57	22	-31,20
III	229,95	-22,93	12	-14,78

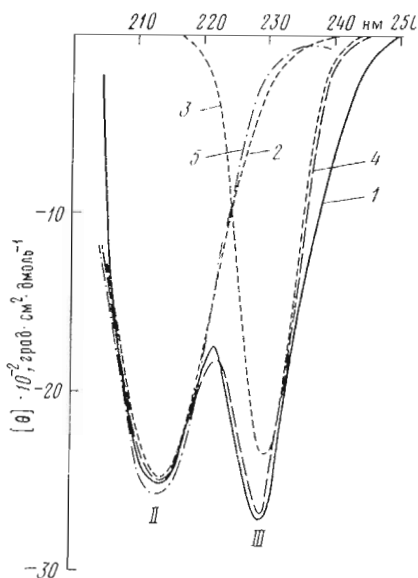


Рис. 2. Экспериментальный (I) и расчетные спектры КД РНКазы в области 205—240 нм в 0,1 М NaCl при рН 5,35 и 24°: 2 — разделенная гауссовая полоса II; 3 — разделенная гауссовая полоса III; 4 — суммарный расчетный спектр; 5 — теоретически рассчитанная полоса II

вляться либо за счет непосредственного взаимодействия моментов переходов индольной и фенольных групп, либо опосредованно, за счет связанного с диссоциацией остатков тирозина конформационного изменения белка.

Из рис. 4 видно, что при концентрациях $G_{un} \cdot HCl$ выше 2 М форма спектра КД резко меняется, а при концентрации агента 2,75 М спектр становится характерным для денатурированных белков. При этом денатурация является полностью обратимой (рис. 5). Одновременное изменение амплитуд этих полос, по-видимому, свидетельствует об одновременном разрушении вторичной и третичной структур белка. Из рис. 5 видно, что переход является кооперативным с точкой полуденатурации, равной 2,3 М $G_{un} \cdot HCl$. Как следует из рис. 6, денатурация РНКазы соответствует представлениям о модели двух состояний [14], однако этот вопрос требует дальнейшего исследования.

мы изучили зависимость формы спектров КД РНКазы в далекой УФ-области от рН. Из рис. 1 видно, что при понижении рН спектры КД существенно образом не меняются. Однако при переходе в щелочную область заметно увеличивается интенсивность полосы III. Как следует из рис. 3, полоса II практически не меняется в широком интервале величин рН. Данные, приведенные в табл. 2, свидетельствуют о том, что процентное содержание различных типов вторичной структуры РНКазы практически не меняется в области значений рН 2,5—11,5. В то же время амплитуда полосы III растет при значениях рН выше 9,5 (рис. 1 и 3), однако ее положение не меняется. Известно, что при значениях рН выше 9—10 происходит диссоциация фенольной группы остатков тирозина, при этом его полосы КД смещаются в длинноволновую область. Полученные данные указывают на то, что полоса III относится, вероятно, к электронным переходам остатков триптофана, состояние которых зависит от степени ионизации остатков тирозина. Очевидно, что такая зависимость может осуществ-

Таблица 2

Определение вторичной структуры РНКазы по реперным спектрам четырех структур [16] (α -спираль, β -структура антипараллельная, β -структура параллельная, неупорядоченная структура) по гауссовой полосе при 214 нм

рН	α	β_a	β_{\parallel}	Неупорядоченная структура
2,56	0,04	0,11	0,11	0,74
4,25	0,04	0,10	0,11	0,75
5,35	0,06	0,11	0,10	0,73
9,52	0,05	0,11	0,10	0,74
10,50	0,04	0,12	0,10	0,74
11,50	0,05	0,12	0,10	0,73

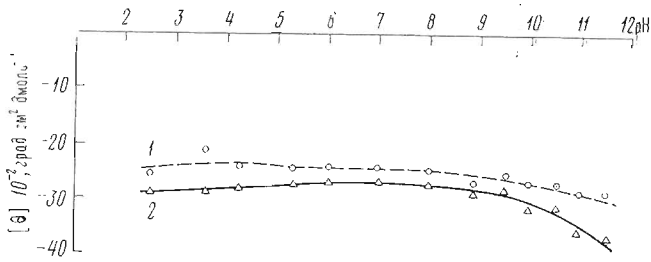


Рис. 3. Зависимость амплитуды полос II и III от величины pH в 0,1 М NaCl при 24°: 1 — полоса II; 2 — полоса III

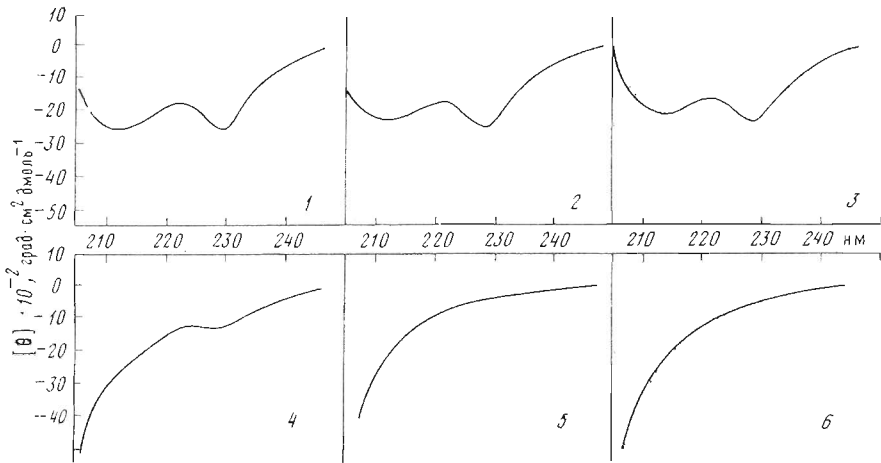


Рис. 4. Спектр КД РНКазы при различных концентрациях GuH·HCl в 0,1 М NaCl при pH 5,35 и 24°: 1 — 1; 2 — 1,5; 3 — 2,1; 4 — 2,25; 5 — 2,75; 6 — 3 М

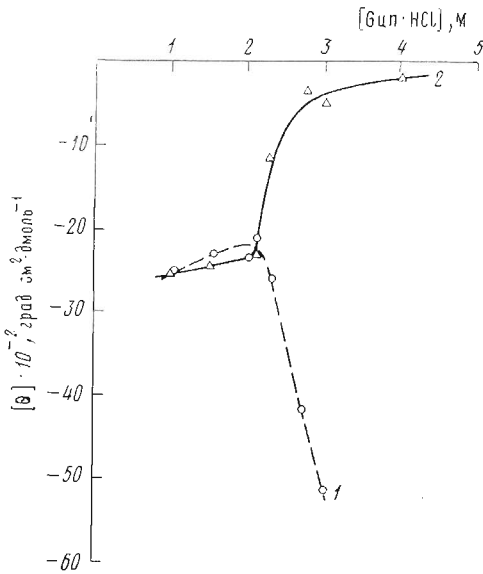


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость амплитуд полос II и III от концентрации GuH·HCl в 0,1 М NaCl при pH 5,35 и 24°: 1 — полоса II; 2 — полоса III

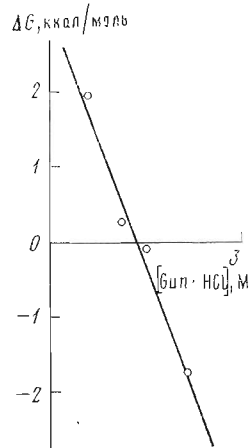


Рис. 6

Рис. 6. Зависимость конформационной свободной энергии РНКазы от концентрации GuH·HCl в 0,1 М NaCl при pH 5,35 и 24°

Таким образом, проведенное исследование показало, что молекула РНКазы практически не содержит α -спиралей, но содержит значительное количество β -структуры. При этом, несмотря на то что в ферменте нет дисульфидных связей, его вторичная структура не изменяется в широком диапазоне значений pH. Под воздействием $\text{Gun}\cdot\text{HCl}$ молекула РНКазы разворачивается, причем процесс кооперативен и, по-видимому, соответствует модели двух состояний. Спектр КД РНКазы в далекой УФ-области является примером, в котором на форму спектра КД выражено влияние электронных переходов в боковых группах ароматических аминокислотных остатков — прямое триптофанов и опосредованное тирозинов.

Экспериментальная часть

РНКазу выделяли по методике, описанной ранее [1]. Фермент гомогенизируют по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и N-концевого аминокислотного анализа.

Спектры КД снимали на дихрографе Jobin-Ivon Marek III (Франция) в кюветках l 0,5 мм при концентрациях фермента 0,4—0,5 мг/мл и температуре 24°. Молярную эллиптичность на средний аминокислотный остаток $[\theta]$ рассчитывали по формуле

$$[\theta] = \Delta\epsilon_{1\text{ см}}^{1\%} \cdot \frac{M}{10} \cdot 3300,$$

где $\Delta\epsilon_{1\text{ см}}^{1\%}$ — круговой дихроизм раствора белка с концентрацией 1% при длине пути луча 1 см, M — средний молекулярный вес остатка, равный 113 из аминокислотного состава РНКазы.

Концентрацию фермента определяли из спектров поглощения, снятых на спектрофотометре Cary-118 (США), исходя из $\epsilon_{1\text{ см}}^{1\%}$ 18 при λ 280 нм, 25° и нейтральных значениях pH [1], pH растворов определяли с помощью рН-метра РНМ-64 (Radiometer, Дания). Растворы белка готовили на деионизованной бидистиллированной воде, содержащей 0,1 M NaCl. Использовали $\text{Gun}\cdot\text{HCl}$ фирмы Sigma (США).

При определении вторичной структуры белка исходили из того, что экспериментальный спектр белка описывается выражением

$$[\theta]_{\lambda} = \sum_i f_i [\theta]_{i\lambda},$$

где f_i — процентное содержание различных упорядоченных структур в белке (α -спираль, антипараллельная и параллельная β -структура, β -изгибы и неупорядоченная форма), а $[\theta]_{i\lambda}$ — значения $[\theta]_i$ при этой длине волны, взятые из реперных спектров КД этих упорядоченных структур. В качестве реперных спектров КД указанных структур применялись новые белковые реперные спектры КД, полученные в работах [6, 12]. Вторичная структура белка определялась путем минимизации различий между рассчитанными $([\theta]_{\lambda}^{\text{расч}})$ и экспериментальными $([\theta]_{\lambda}^{\text{эксп}})$ значениями спектров КД по нелинейному методу наименьших квадратов при наличии условий $\sum_i f_i = 1$ и $f_i \geq 0$. Аналогичные методы применялись ранее в работах Магара [15], Гринфелда и Фасмана [3], Чена, Янга и др. [4, 5].

Минимизация функционала

$$S = \sum_{\lambda} ([\theta]_{\lambda}^{\text{расч}} - [\theta]_{\lambda}^{\text{эксп}})^2$$

производилась по итерационному методу Флетчера — Ривса [16]. Расчеты проводились на ЭВМ БЭСМ-6. При этом использовались все спектры КД в интервале длин волн от 205 до 240 нм, значения $[\theta]_{\lambda}$ брали через 1 нм.

Спектр КД РНКазы в области 205—240 нм вначале делили на 2 гауссовы полосы с помощью ЭВМ Hewlett Packard, модель 9830А. Правиль-

ность разложения контролировалась условием минимальности различий между экспериментальным спектром КД в этой области и суммарной огибающей двух гауссовых полос. Расчет вторичной структуры РНКазы проводили по ее выделенной пептидной полосе II, к которой применяли вышеописанную общую методику.

Авторы благодарят М. Я. Карпейского за постоянное внимание к работе, В. О. Чехова за предоставление программ для ЭВМ БЭСМ-6 и Hewlett Packard и помощь в математической обработке результатов, И. А. Голубенко за помощь при получении гомогенного фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лещинская М. Б., Булгакова Р. Ш., Балабан Н. П., Егорова Г. С. (1974) Прикл. биохимия и микробиол., 10, 242—247.
2. Болотина И. А. (1973) в кн.: Итоги науки и техники, серия «Молекулярная биология», под ред. М. В. Волькенштейна, т. 1, с. 61—104.
3. Greenfield N., Fasman G. D. (1968) Biochemistry, 8, 4108—4116.
4. Chen I. H., Yang J. T., Martinez H. M. (1972) Biochemistry, 11, 4120—4131.
5. Chen I. H., Yang J. T., Chan K. H. (1974) Biochemistry, 13, 3350—3359.
6. Болотина И. А., Чехов В. О., Лугаускас В. Ю., Финкельштейн А. В., Птицын О. Б. (1978) Тезисы «Квантовая химия, биология, фармакология», Киев.
7. Fasman G. D., Hoving H., Timasheff S. N. (1970) Biochemistry, 9, 3316—3324.
8. Morrisett J. D., Broomfield C. A. (1971) J. Amer. Chem. Soc., 93, 7297—7304.
9. Коган Г. А., Козлов Л. В., Чехмеева Н. М., Слободянская Е. М., Антонов В. К. (1973) Молекулярн. биология, 7, 596—607.
10. Holowka D. A., Strosberg A. D., Kimball J. W., Haber E., Cathon R. E. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 3399—3403.
11. Chang C. C., Yang C. C., Hamaguchi K., Nakai K., Hayashi K. (1971) Biochim. et biophys. acta, 236, 164—173.
12. Болотина И. А., Чехов В. О., Лугаускас В. Ю., Финкельштейн А. В., Птицын О. Б. (1977) Тезисы доклада на Всес. симпозиуме «Конформации биополимеров в растворах», Тбилиси.
13. Tsetlin V. I., Mikhaleva I. I., Myagkova M. A., Senjavina L. B., Arseniev A. S., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. (1975) Ann. Arbor Science Peptides: Chemistry, Structure and Biology, pp. 935—941.
14. Tanford Ch. (1968) Adv. Protein Chem., 23, 122—282.
15. Magar M. E. (1968) Biochemistry, 7, 617—620.
16. Fletcher R., Reeves C. M. (1964) Computer J., 7, 149—155.

Поступила в редакцию
29.VI.1978

BACILLUS INTERMEDIUS 7P RIBONUCLEASE. CIRCULAR DICHROISM STUDIES OF THE SECONDARY STRUCTURE IN SOLUTION

BOLOTINA I. A., DUDKIN S. M., LUGAUSKAS V. Yu., KHANDANYAN A. G.,
LESHCHINSKAYA I. B.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow; Kazan State University, Kazan*

Far ultraviolet circular dichroic (CD) spectra of *Bacillus intermedius* 7P RNAase have been measured at different pH values as well as in guanidine hydrochloride solutions. The experimental spectra in the 205-240 nm were resolved into two bands. One of them (214 nm) was attributed to electronic transitions of the protein amide chromophores and the other (230 nm) — to those in tryptophan residues, whose state was dependent on the ionization state of tyrosine residues. Analysis of the 214 nm CD band revealed low α -helical content (6%) and appreciable amount (20%) of β -structural regions. Although RNAase contains no disulfide bridges it manifested a high stability over the pH range 2.5-11.5. Analysis of CD spectra in far UV region, taken in the presence of varying amounts of guanidine hydrochloride, indicated the enzyme denaturation to be a cooperative process (with the transition midpoint at 2.3 M) which could be interpreted in terms of the two-state transition.