

Т. НЕЭМЕ, Э. ЛИППМАА

О КОЛЕБАНИЯХ СУЛЬФИДРИЛЬНОГО ТИТРА АМИНОКИСЛОТ И ПРЕПАРАТОВ АКТОМИОЗИНА

По гипотезе Р. Ламри и Р. Билтонена [1], каталитическая активность ферментов объясняется не только действием полярных групп активного центра, но и способностью макромолекул белка и окружающей воды к аккумуляции и перераспределению механической свободной энергии. Этим вызвана актуальность вопроса о синхронных спонтанных колебаниях химических свойств и конформации актомиозина [2].

Колебания АТФ-азной активности белков актомиозинового комплекса имеют амплитуду 8—30% от среднеарифметического уровня ферментативной активности [3] и период при медленных изменениях около минуты, при быстрых — порядка десятых долей секунды. В еще большей степени колеблется титр SH-групп: аргентометрический титр актомиозина, разбавленного водой, величиной 1,10 мл AgNO_3 ($5 \cdot 10^{-4}$ н.) изменялся в пределах $\pm 55\%$ [4]. Иногда АТФ-азная активность и титр SH-групп изменяются синфазно. Основная часть экспериментального материала получена путем ручного пипетирования отдельных и по замыслу процедуры опыта идентичных порций растворов. Благодаря тому, что аммиачный буфер оказывается фиксатором колебаний SH-титра [4, 5], метод амперометрического титрования можно применять в этом случае.

Целью настоящей работы, как и предыдущих [6, 7], было исследование подобных реакций в условиях, до известной степени аналогичных инкубированию актомиозина.

Методика

Аргентометрический титр SH-групп определяли на установке амперометрического титрования. Индикаторный платиновый цилиндрический электрод с поверхностью 6,2 мм² приводился во вращение синхронным мотором со скоростью 800 об/мин. Поверхность каломельного электрода сравнения была 23 см². Контакт с электродом сравнения осуществлялся через дно сосуда, представлявшего собой стеклянный фильтр, импрегнированный силикагелем и дополнительно защищенный пробкой из насыщенного раствора хлорида калия на агар-геле. Титрование в аммиачном буфере pH 9 проводилось при потенциале —0,4 в. Цилиндрический сосудик для титрования диаметром 20 мм можно было герметизировать, а капиллярные кончики бюреток погружать в глубь сосуда так, чтобы после наливания 4 мл фонового буфера остальные растворы могли протекать в него уже без соприкосновения с газовой фазой. По мере возможности в работе пользовались бюретками, а не пипетками; бюретки буфера, растворов глутатиона и цистеина, а также сосудик возможно

было продувать аргоном или кислородом. Концентрация раствора нитрата серебра составляла 10^{-3} н. Титрант находился в 5-миллилитровой микробюретке и подавался порциями через равные интервалы времени (обычно 1 мин). Исследуемые вещества — аминокислоты и белок — прибавлялись в объеме 1 мл, при этом концентрация аминокислот составляла 10^{-3} н. Точность определения 0,3 мг глутатиона или 0,15 мг цистеина при повторных определениях равнялась $\pm 2\%$.

Препараты актомиозина были изготовлены из лягушек. Мышцы задних ножек размельчали на холоде сначала ножницами, потом микро-размельчителем тканей РТ-2. Затем проводились три экстракции в 10-кратном объеме ледяного бидистиллята продолжительностью 1,5; 1,0 и 0,5 ч. Оставшуюся массу выжимали через три слоя марли. После третьей экстракции актомиозин был растворен в 2,5-кратном объеме 0,6 или 1,2 молярного хлорида калия (о. ч.) и 0,03 молярного NaHCO_3 (о. ч.). Утром следующего дня нерастворенную часть и пузырьки воздуха отделяли на центрифуге. Гомогенный надосадочный гель хранили при низких положительных температурах.

Результаты и обсуждение

Толчком к дальнейшим опытам послужили наблюдения за титром 10^{-4} н. раствора цистеина в воде. Раствор 32 дня стоял нетронутым при комнатной температуре. После этого, отбирая пипеткой через каждые 15 мин 10 мл пробы, мы получили титры 0,86; 0,46; 0,14; 0,12 мл AgNO_3 (10^{-3} н.). За месяц титр спонтанно упал лишь на 30%, в то время как при взятии проб во всем объеме раствора (около 300 мл) SH-группы уменьшались за полчаса до 12% от их первоначального количества и вскоре титр упал до нуля. Это свидетельствует об автокаталитическом характере окисления SH-групп. Известно, что высокие значения pH ускоряют окисление тиолов [8, 9]. Стало необходимым исследовать, отличается ли поведение SH-групп актомиозина от поведения SH-групп аминокислот в условиях исследования спонтанных синхронных колебаний.

Пипетированные вручную и инкубированные в аммиачном буфере порции цистеина или глутатиона изменялись уже через несколько десятков минут, если исходный раствор при хранении содержал воздух. Полное окисление SH-групп в наших условиях происходило через 3–6 ч (1 часть 10^{-3} н. тиола в 4-х частях 0,2 н. буфера). Скорость окисления очень изменчива. Если инкубировать равные порции на водяной бане, то изменение титра во времени происходит не плавно, а скачкообразно. Периоды быстрого окисления чередуются с периодами относительной стабильности титра. В одном опыте наибольший разброс отмечался в интервале от 50 до 70 мин с начала инкубирования. Достигнутая в таких опытах максимальная скорость уменьшения титра составляла 72% за 35 мин.

Если цистеин и буфер смешать в одной бюретке, из которой выливаются порции для титрования, то можно регулировать количество растворенного кислорода. Продувание аргоном всех компонентов до перемешивания, титрование в его атмосфере и поддержание слабого стационарного протока аргона в реакционной смеси значительно увеличили время сохранения всех SH-групп [7]. При переходе на режим интенсивного продувания кислородом примерно за 3 ч окислялись почти все сульфгидрилы.

При обогащении смеси кислородом окисление шло более или менее регулярно. Аргентометрический титр сначала увеличился, а затем в

колебательном режиме стал падать. (Склонность тиоловых соединений к дополнительному связыванию ионов серебра обнаружена и изучена во многих работах, например [10–12, 8], однако здесь мы имеем дело с увеличением титра по сравнению с первоначальным его значением.) Возникновение относительно стабильного колебательного режима увеличило время полного окисления в наших условиях до 8–10 ч. Амплитуды таких изменений составляли 10–15% от первоначального титра, период — около часа (рис. 1).

В других опытах во время быстрых нерегулярных изменений титр мог падать до 70%. Наибольшее наблюдаемое увеличение было 30%.

При старении растворов тенденция к ступенчатому окислению увеличивается. Измеряя титр сразу после 10-кратного разбавления 10^{-2} н. раствора цистеина, стоявшего 23 дня в холодильнике, мы вначале зарегистрировали несколько небольших скачков (рис. 2). После пропускания через смесь буфера с цистеином аргона уже через 1 мин произошло увеличение титра. Следующие семь определений свидетельствовали о колебательной кинетике стабилизации нового титра. Первое измерение, сделанное после 18-часовой неподвижности раствора, показало, что уровень SH-титра сохраняется, однако через 80 мин снова обнаружилось спонтанное понижение титра. На этот раз в бюретку пустили кислород. Уже одноминутное продувание индуцировало увеличение титра. Следующие семь определений свидетельствовали о затухающей колебательной кинетике изменения титра. Новый, относительно стабильный уровень титра находился, разумеется, значительно ниже. Во время двух измерений, проведенных через 4 ч, титр упал до нуля.

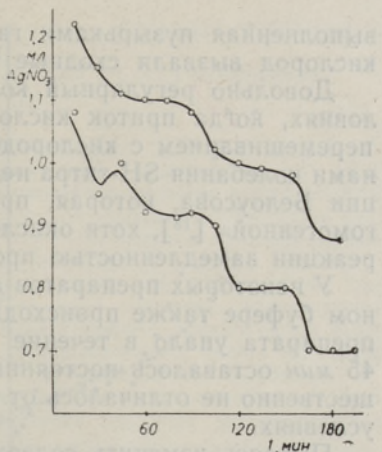


Рис. 1. Изменение аргентометрического титра цистеина в аммиачном буфере при продувании смеси кислородом.

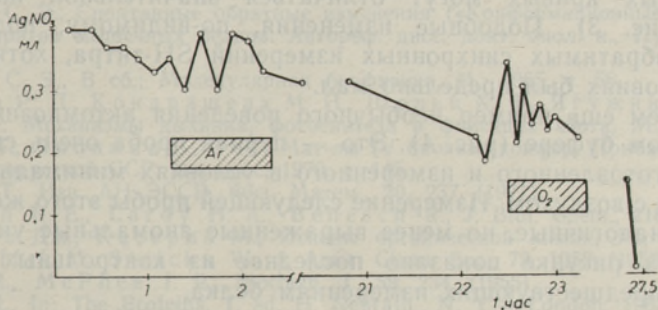


Рис. 2. Колебания аргентометрического титра цистеина в аммиачном буфере при неподвижном растворе, а также при продувании аргоном и кислородом.

Мы склонны думать, что и в случае актомиозина аммиачный буфер ускоряет прохождение инкубационной фазы окисления, создавая тем самым известный в литературе эффект фиксации SH-титра. Существенной при возникновении колебаний является также механическая работа,

выполненная пузырьками газа при перемешивании. Ведь и аргон, и кислород вызвали сходные колебания.

Довольно регулярный колебательный режим зарегистрирован в условиях, когда приток кислорода из баллона заменяется интенсивным перемешиванием с кислородом воздуха [7]. В этом смысле измеренные нами колебания SH-титра не уступают управляемой колебательной реакции Белоусова, которая, протекая в растворе, является «существенно гомогенной» [13], хотя окисление тиолов отличается от вышеупомянутой реакции замедленностью процесса.

У некоторых препаратов актомиозина изменение SH-титра в аммиачном буфере также происходит скачками. Количество SH-групп свежего препарата упало в течение 15 мин на 35%, а в течение последующих 45 мин оставалось постоянным. Поведение SH-групп данного белка существенно не отличалось от поведения их у аминокислот в аналогичных условиях.

Пытаясь изменить содержание кислорода в смеси буфера с белком в двух препаратах из семнадцати, мы наблюдали увеличение во времени прироста аргентометрического титра. Факты обратимости реакций белка говорят в пользу гипотезы спонтанных колебаний. Однако во время измерений произошло адсорбирование белка на электроде, в результате чего на эффект накладывалась возросшая в ходе дальнейших измерений ошибка. Доступность поверхности электрода ионам серебра в разных определениях в разной степени колебалась. Полученные данные, по-видимому, недостаточно полно характеризуют изменение SH-титра.

Выводы о реактивности SH-групп белка можно делать на основе опытов по регулированию содержания кислорода лишь в очень ограниченной степени, так как механические нарушения и частичная пленочная денатурация не имеют аналогов у цистеина и глутатиона.

Скачкообразное неконтролируемое изменение титра у находящихся в соприкосновении с воздухом растворов аминокислот может возникнуть уже при измерении внесенного в комнату холодного раствора, при разбавлении и нарушении его неподвижности. Во время исследований SH-групп белка надо стараться избегать их соприкосновения с воздухом.

Для некоторых порций очень свежего раствора актомиозина формы титровальных кривых могут отличаться значительной индивидуальностью (рис. 3). Подобные изменения, по-видимому, подтверждают гипотезу обратимых синхронных измерений SH-титра, хотя эффект в наших условиях был предельно мал.

Приведем еще пример необычного поведения актомиозина лягушки в аммиачном буфере (рис. 4). Это — первая проба очень свежего препарата, изготовленного и измеренного в условиях минимального соприкосновения с воздухом. Измерение следующей пробы этого же препарата выявило аналогичные, но менее выраженные аномальные участки. Крестиками на рисунке показано последнее из контрольных измерений цистеина, предшествующих измерениям белка.

Специфичность скачкообразных измерений SH-титра актомиозина в аммиачном буфере может выясниться по мере дальнейшего изучения SH-групп аминокислот. Возможно окажется, что конформационные колебания SH-титра актомиозина и автокаталитическое окисление SH-групп аминокислот — процессы разные, даже не связанные между собой.

Наши предварительные качественные результаты выявляют, однако, больше сходств, чем различий между поведением SH-групп белка и аминокислот.

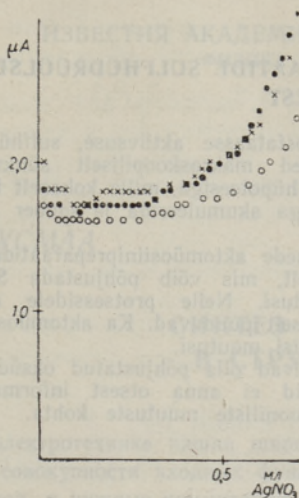


Рис. 3. Кривые титрования трех первых проб свежего препарата актомицина.

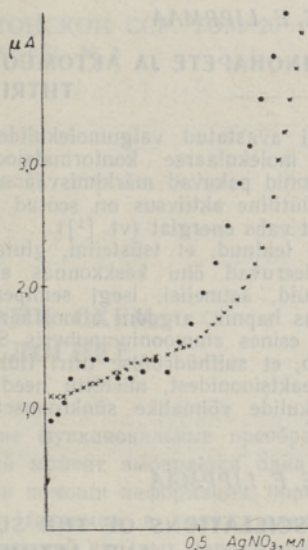


Рис. 4. Кривые титрования.
● — актомицин; × — цистеин.

Авторы выражают глубокую признательность доктору биологических наук С. Шнолю за возможность ознакомления с выработанной под его руководством экспериментальной методикой и за многократные обсуждения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lumry R., Biltonen R., In: Structure and Stability of Biological Macromolecules, ed. S. N. Timasheff and G. D. Fasman, N. Y., 1969, p. 65.
2. Шноль С. Э., *Вопр. мед. химии*, 4 (6), 443 (1958).
3. Шноль С. Э., Спонтанные обратные изменения («Конформационные колебания») препаратов мышечных белков. Автореф. дисс. докт. биол. н., Пущино-на-Оке, 1970.
4. Шноль С. Э., В сб.: Молекулярная биофизика, М., 1965, с. 56.
5. Озрина Р. П., Кондрашева М. Н., Шольц Х. Ф., Ягужинский Л. С., В сб.: Механизмы дыхания, фотосинтеза и фиксации азота, М., 1967, с. 71.
6. Неэме Т., Липпмаа Э., В сб.: Мат-лы IV биохим. конфер. Прибалт. республик и Белорусской ССР, Вильнюс, 1970, с. 145.
7. Неэме Т., *Изв. АН ЭССР, Физ. Матем.*, 20, 237 (1971).
8. Benesch R. E., Lardy H. A., Benesch R., *J. Biol. Chem.*, 216, 663 (1955).
9. Робертс Дж., Касерио М., *Основы органической химии*, М., 1968, с. 105.
10. Kolthoff I. M., Stricks W., *J. Amer. Chem. Soc.*, 72, 1952 (1950).
11. Cecil R., McPhee I. R., *Biochem. J.*, 59, 234 (1955).
12. Cecil R., In: *The Proteins*, 1, ed. H. Neurath, N. Y.—London, 1963, p. 379.
13. Жаботинский А. М., В сб.: Колебательные процессы в биологических и химических системах, М., 1967, с. 149.

Институт кибернетики
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
24/IX 1970

T. NEEME, E. LIPPMAA

AMINOHAPETE JA AKTOMÜOSIINIPREPARAATIDE SULFHÜDRÜULSE
TIITRI VÕNKUMISEST

Shnolli avastatud valgumolekulide adenosintrifosfataase aktiivsuse, sulfhüdrüülse tiitri ja molekulaarse konformatsiooni spontaansed makroskoopiliselt sünkroonsed fluktuatsioonid pakuvad märkimisväärset huvi seoses hüpoteesiga, mille kohaselt fermentide katalüütiline aktiivsus on seotud valkude võimega akumuleerida ja ümber jaotada mehaanilist vaba energiat (vt. [1]).

Oleme leidnud, et tsüsteini, glutatiooni ja mõnede aktomüosiinipreparaatide lahused oksüdeeruvad õhu keskkonnas autokatalüütiliselt, mis võib põhjustada SH-tiitri korrapäratuid, astmelisi, isegi semiperioodilisi muutusi. Neile protsessidele avaldab mõju puhas hapnik, argooni atmosfääris nad praktiliselt puuduvad. Ka aktomüosiinipreparaatidel esines ammoniumpuhvrts SH-tiitri astmelisi muutusi.

Ilmneb, et sulfhüdrüülse tiitri fluktuatsioonid võivad olla põhjustatud oksüdatiivsetest ahelreaktsioonidest, mistõttu need fluktuatsioonid ei anna otsest informatsiooni valgumolekulide võimalike sünkroonsete konformatsiooniliste muutuste kohta.

T. NEEME, E. LIPPMAA

OSCILLATIONS OF THE SULFHYDRYL TITRE OF AMINO ACIDS
AND ACTOMYOSIN PREPARATIONS

Since the hypothesis that the catalytic activity of enzymes is related to the ability of the proteins for the accumulation and redistribution of mechanical free energy is gaining in importance (see [1]), the spontaneous and macroscopically synchronous fluctuations of the adenosintriphosphatase activity, the sulfhydryl titre and molecular conformation as reported by Shnoll are of considerable interest.

We have found that solutions of cysteine, glutathione and some actomyosin preparations, if exposed to air, undergo autocatalytic oxidation that can lead to irregular, step-like and even semiperiodic changes of the SH-titre. These processes are influenced by pure oxygen, being practically absent in argon atmosphere. Actomyosin preparations in ammonia buffer likewise showed step-like changes of the SH-titre.

It appears that fluctuations of the SH-titre may be caused by oxidative chain reactions and give no direct information about the possible conformational changes of protein molecules.