

УДК 576.858.9

БИОХИМИЯ

Б. Ф. ПОГЛАЗОВ, М. Т. ЛЕВШЕНКО

ПРОТЕИНАЗА, ИНДУЦИРОВАННАЯ БАКТЕРИОФАГОМ Т4Д

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 2 I 1974)

Установлено (1), что приблизительно на 11-й мин. после инфицирования *Escherichia coli* фагом T4Д начинают накапливаться три коротких пептида. По предположению авторов обнаруженные пептиды отщепляются от белков-предшественников, которые закодированы в ДНК фага. В дальнейшем выяснилось, что продукты четырех генов (P22, P23, P24 и внутренний белок), ответственные за формирование головки бактериофага T4, претерпевают модификацию в процессе сборки частицы бактериофага, заключающуюся в отщеплении от указанных белков довольно коротких пептидов (2-4). В связи с этим возникает предположение, что при заражении бактериальной клетки фагом образуется крайне специфичная протеиназа, которая отщепляет короткие фрагменты от фаговых белков-предшественников. В настоящей работе мы исследовали изменение протеолитической активности клеток *E. coli* после заражения, используя в качестве субстрата α , *N*-бензоил-*D,L*-аргинин-*n*-нитроанилид (БАПА), предложенный Эрленгером и соавторами (5) и получивший широкое распространение как специфический субстрат для трипсина и трипсиноподобных ферментов. Удобство работы с БАПА заключается в его крайней чувствительности, позволяющей выявить фермент в концентрации до 1 мкг/мл, и в изменении окраски (появлении желтого окрашивания) при расщеплении БАПА ферментом. Желтое окрашивание обусловливается образованием в результате гидролиза *n*-нитроанилина, который имеет максимум поглощения при 380 мкм.

Бактериальную массу *E. coli* выращивали на синтетической среде при 37° с постоянной умеренной аэрацией до достижения логарифмической фазы с концентрацией 4—5·10⁸ клеток/мл. Далее в культуру вносили хроматографически чистый препарат бактериофага T4Д с множественностью заражения, равной 10, полученный по описанному ранее методу (6). Начиная с момента заражения и далее с интервалом в 2 или 3 мин. производили отбор проб (по 20 мл), которые быстро (в течение 30 сек.) охлаждали до 2°. В отобранных пробах осаждали бактериальные клетки центрифугированием при 5000 *g* в течение 20 мин. Осадок суспендировали в 2 мл дистиллированной воды и обрабатывали в ультразвуковом дезинтеграторе фирмы MSE с мощностью 20 квт в течение 4 мин. Полученную суспензию освобождали от клеточных обломков центрифугированием при 5000 *g* в течение 20 мин. и использовали для определения ферментативной активности.

Ферментативные пробы ставили следующим образом. К 2 мл полученного клеточного экстракта добавляли 2 мл 0,5·10⁻³ *M* БАПА, растворенного в 1 *M* K₂Na-фосфатном буфере соответствующего pH и инкубировали при 37° в течение 30 мин. до появления окрашивания. Затем производили инактивацию ферментов выдерживанием в кипящей водяной бане в течение 10 мин. и измеряли поглощение раствора при 410 мкм. Область 410 мкм была выбрана вследствие того, что здесь полностью исключено наложение спектра поглощения нерасщепленного БАПА. Количество выделившегося в результате реакции *n*-нитроанилина определяли, используя молярный коэффициент экстинкции.

В первых же экспериментах выявилась интересная закономерность. Оказалось (рис. 1), что протеиназная активность клеточных экстрактов, взятых в нейтральной области рН, снижается после заражения клеток бактериофагом. Максимальное ингибирование, достигаемое через 8 мин. после заражения, соответствует 30%. Наиболее интересным, на наш взгляд, является последующее нарастание активности, достигающее максимума (40%) на 18-й мин. после заражения. Результаты этих опытов позволили нам сделать предположение о том, что после инфицирования бактериофагом собственно клеточная протеиназа (или протеиназы) инактивируется и вместо нее синтезируется протеиназа, принадлежащая бак-

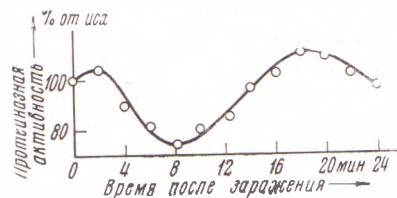


Рис. 1. Изменение протеиназной активности экстрактов из клеток *Escherichia coli*, зараженных бактериофагом T4D. Ферментативная реакция в 0,5 M K, Na-фосфатном буфере, pH 6,7

териофагу. Ингибирование хозяйствской протеиназы несомненно оправдано, так как оно позволяет защитить вновь синтезирующиеся белки бактериофага от ее действия. Образующийся новый трипсинаподобный фермент, по-видимому, обладает очень строгой специфичностью, направленной лишь на модификацию некоторых белков фага. Очень важен и тот факт, что наибольшее количество фаговой протеиназы накапливается к 18-й мин., т. е. к тому времени, когда наступает фаза интенсивной сборки вирусной частицы. Можно думать, это тот самый фермент, который отщепляет пептиды от продуктов генов 22, 23, 24 и от внутреннего белка, инициируя таким образом сборку головки бактериофага.

Предполагая появление нового фермента, мы провели далее определение зависимости протеиназной активности экстрактов от рН. При этом

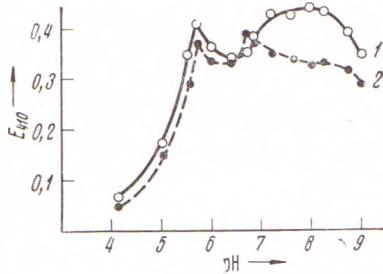


Рис. 2. Зависимость протеиназной активности экстрактов из неинфицированных (1) и инфицированных (2) клеток *E. coli* от pH



Рис. 3. Изменение активности кислой протеиназы клетки-хозяина после заражения бактериофагом. Ферментативная реакция в 0,5 M K, Na-фосфатном буфере, pH 5,7

были поставлены две серии опытов: в одной из них исследовалось изменение протеиназной активности экстрактов из незараженных клеток; в другой серии был взят экстракт через 18 мин. после заражения *E. coli* бактериофагом.

На рис. 2 видно, что протеиназная активность клетки хозяина имеет два максимума — при pH 5,5–5,7 и pH 7,2–8,2, а в зараженной клетке появляется еще один максимум при pH 6,7. Эти опыты подтвердили наше предположение о возникновении нового фагового фермента с иными свойствами. Установив, таким образом, оптимальные значения pH для протеиназ клетки хозяина и протеиназы бактериофага, мы получили возможность проверить поведение активности этих трех групп ферментов после

заражения клетки фагом во времени. Для этого мы определили изменение активности экстрактов из зараженных клеток при найденных значениях рН. Выяснилось, что во всех условиях (рН 5,7; 6,7; 7,7) вначале после заражения наблюдается подавление протеиназной активности. Последующее ее значительное нарастание наблюдается в области рН 6,7 (рис. 1) и в меньшей степени при рН 7,7. При кислых значениях рН (5,7) нарастание активности отсутствует полностью (рис. 3). Некоторое нарастание активности, наблюдавшееся при рН 7,7, по-видимому, можно объяснить наложением активности соседнего фермента (рН 6,7) хотя, несомненно, для подкрепления этого предположения нужны более прямые доказательства.

Коэн⁽⁷⁾ указывал на важность идеи о возможном существовании протеиназы, индуцируемой бактериофагом. Действительно, обнаружение этого фермента может помочь не только в объяснении происхождения коротких пептидов при созревании фага, но также понять некоторые детали механизма сборки вирусной частицы. В 1953 году была сделана попытка изучения протеиназной активности *E. coli* после инфицирования бактериофагом⁽⁸⁾. Однако вследствие чрезвычайно малой чувствительности использовавшегося метода авторы не смогли выявить каких-либо изменений и сделали вывод только о прекращении синтеза бактериальной протеиназы. В наших же опытах удалось показать, что происходит не просто прекращение синтеза, но и ингибирование активности клеточной протеиназы. Обнаружение индукции новой протеиназы открывает перспективы ее изолирования и изучения действия *in vitro* на фаговые белки-предшественники и, в первую очередь, на продукт гена 23. Весьма заманчивым является проверка наличия такого фермента у ряда мутантов фага, неспособных к расщеплению белков-предшественников. Разработка этих проблем стоит в плане нашей ближайшей деятельности.

Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова

Поступило
19 XII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. L. Eddleman, S. P. Champe, *Virology*, v. 30, 471 (1966). ² U. K. Laemmli, *Nature*, v. 227, 680 (1970). ³ J. Hosoda, R. Cone, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 66, 1275 (1970). ⁴ E. Kellenberger, C. Kellenberger-van der Kamp, *FEBS Letters*, v. 8, 140 (1970). ⁵ B. F. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen, *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 95, 271 (1961). ⁶ B. F. Poglavov, S. N. Bohrsenius, E. M. Belavtseva, *Virology*, v. 25, 650 (1965). ⁷ S. S. Cohen, *Virus-induced Enzymes*, N. Y.—London, 1968. ⁸ A. B. Pardee, I. Williams, *Ann. Inst. Pasteur.*, v. 84, 147 (1953).