

Ю. Д. АХМЕДОВ, Г. И. ЛИХТЕНШТЕЙН, Л. В. ИВАНОВ,  
Ю. В. КОХАНОВ

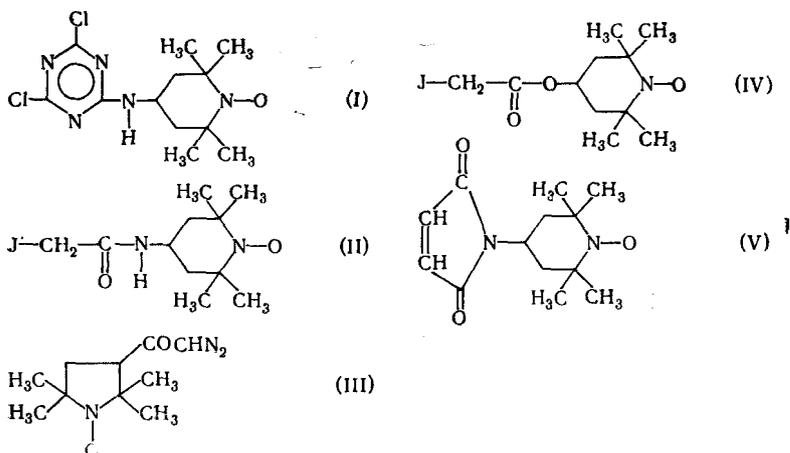
ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСГЛОБУЛЯРНЫХ ЭФФЕКТОВ  
В ЛИЗОЦИМЕ МЕТОДОМ СПИНОВОЙ МЕТКИ

(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 23 IX 1971)

Современные теории ферментативного катализа связывают уникальные каталитические свойства ферментов с их многофункциональностью и динамической структурой (<sup>1-5</sup>). Удобным объектом для исследования роли этих факторов является фермент лизоцим. Работы по рентгеноструктурному анализу (<sup>6</sup>), по физико-химическим (<sup>7, 8</sup>) и кинетическим свойствам лизоцима (<sup>7</sup>) открыли новые интересные перспективы для исследования детального механизма действия этого фермента.

Настоящая работа посвящена изучению направленности трансглобулярных эффектов по различным участкам белковой макромолекулы лизоцима. Для этой цели использовались спиновые метки различной длины и гибкости, которые избирательно присоединялись как к остатку гистидина-15 (гис), так и к поверхностным  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-группам лизина 13, 97 и 96 (лиз). Была сделана попытка модифицировать также карбоксильную группу аспарагиновой кислоты-52 (асп) и  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-группу лизина-1.

В работе использовались препараты лизоцима из белка куриных яиц фирмы Chem. Co; N-ацетил-D-глюкозоамин (АГА) марки ч. Применялись следующие спиновые метки.



Метка I синтезировалась по методике (<sup>10</sup>), метки II, IV и V — по (<sup>11</sup>), метка III — по (<sup>12</sup>). Синтез спин-меченых препаратов проводили путем инкубации лизоцима  $C = 10^{-3} M$  с раствором соответствующей метки  $2 \cdot 10^{-2} M$  при pH, указанных в табл. 1; инкубационная смесь очищалась на Сефадексе Fine G-25. Определение числа меток на макромолекулу, измерения э.п.р., опыты с ингибиторами проводились аналогично описанным в (<sup>9</sup>). Активность лизоцима определялась по методике (<sup>13</sup>). В каждом случае рассчитывались параметры вращения спиновых меток на белках  $\nu$  (<sup>11</sup>), а также относительные изменения интенсивностей компонент спектров э.п.р.  $h_{+1}$ ,  $h_0$  и  $h_{-1}$ , где индексы +1, 0 и -1 соответствуют значению ядерного магнитного квантового числа.

Основные результаты по модификации различных остатков лизоцима приведены в табл. 1. Идентификация модифицируемых групп проводилась следующим образом. Гистидин-15 лизоцима блокировали со специфическими реагентами при pH 6,2 (<sup>9</sup>, <sup>14</sup>), затем инкубировали со спиновой меткой I. Присоединение меток по ε-NH<sub>2</sub> лизиновым группам проводили при pH 9,0 физически. В этих условиях алкилируются только ε-NH<sub>2</sub>-группы. Анализ спектров э.п.р. модифицированных образцов по методу двойной метки приводит к заключению о блокировании лизинов 13, 97 и 96 (<sup>9</sup>, <sup>15</sup>). Отнесение алкилированных групп при взаимодействии лизоцима с меткой V к гистидину-15 и α-NH<sub>2</sub> — лизину-1 проводилось по

Таблица 1

Основные свойства препаратов лизоцима, модифицированных спиновыми метками

Препараты	Метка, условия посадки, число меток на макромолекулу	Предполагаемая локализация метки	Относительная ферментативная активность
Лизоцим 0	Нативный лизоцим		1
Лизоцим 1	подацетат, pH 6,2; $n \sim 1$	гис-15	$\sim 1$
Лизоцим 1а	I, pH 6,2, $n \approx 0,95$	гис-15	0,94
Лизоцим 1б	II, pH 6,2, $n \approx 1,1$	гис-15	0,96
Лизоцим 1в	IV, pH 6,2, $n \approx 0,85$	гис-15	0,96
Лизоцим 2	I + лизоцим 1а, pH 9,0, $n \approx 2,9$	лиз-13, 97, 96	0,90
Лизоцим 3	V, pH 6,2, $n \approx 1,5$	гис-15 лиз-1	0,93
Лизоцим 4	III, pH 3,9, $n \approx 0,55$	асп-52	0,45

аналогии с результатами работ (<sup>16</sup>) и по методу двойной метки (<sup>9</sup>, <sup>15</sup>). Подробности этого анализа будут опубликованы позднее.

Основные результаты по влиянию связывания специфического ингибитора АГА лизоцимом на параметры спектров э.п.р. спиновых меток, присоединенных в различных участках белковой глобулы, представлены на рис. 1 и в табл. 1. Эти результаты могут быть суммированы следующим образом.

1. Почти для всех спин-меченых препаратов лизоцима (табл. 1) наблюдается корреляция между изменениями параметров спектров э.п.р. степенью связывания ингибитора активным центром фермента.

2. По мере увеличения гибкости меток, присоединенных к гистидинам-15 в препаратах лизоцима 1а, 1б, 1в, относительные изменения в спектрах ( $\bar{Y}_{\pm 1}$ ) ослабевают (рис. 1). Аналогично, для препаратов лизоцима 2 (лизиновые группы) эффект слабее, чем для менее гибкой «ножки» в препарате лизоцима I. Ослабление эффекта, по-видимому, связано с тем, что он передается от участка с активного центра на противоположную сторону через белковую глобулу по мере уменьшения связи с матрицей в более гибких метках.

3. Спиновая метка I на более длинных и гибких лизиновых группах препаратов лизоцима 2 чувствует посадку АГА в активном центре сильнее, чем более короткие метки на гистидине-15 в препаратах 1в и 1б. Конформационная волна от активного центра передается не только в район гистидина-15, но направляется также в окрестности лизиновых групп 13, 97, 96.

4. Мальмидная метка на гистидине-15 и, вероятно, на концевой α-NH<sub>2</sub> — лизина-1 (лизоцим 3), характеризующаяся довольно высокой экспериментальной частотой  $\nu$ , суммарно чувствует эффект сильнее, чем менее длинные метки на гистидине-15 в лизоцимах 1б и 1в. Можно полагать, что конформационная волна доходит до α-NH<sub>2</sub> концевой группы лизина-1, расположенной в нижней части белковой глобулы (как это представлено на схеме Филлипса в работе (<sup>6</sup>)).

Совокупность изложенных выше результатов вместе с известными данными (6-9) показывают, что взаимодействие лизоцима со специфическими ингибиторами вызывают индуцированную перестройку не только ближайших, непосредственно контактирующих участков белковой матрицы, но и трансглобулярные кооперативные эффекты, направленные

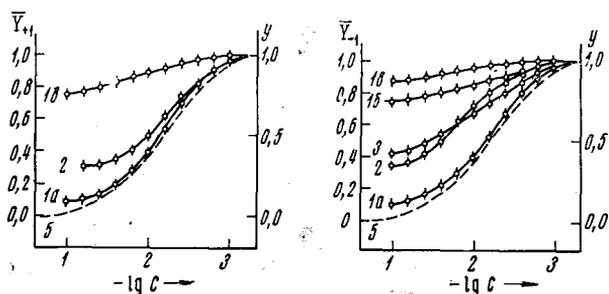


Рис. 1. Зависимость относительных изменений параметров спектров э.п.р.  $h_0/h_{+1}(Y_{+1})$  и  $h_0/h_{-1}(Y_{-1})$ , а также относительной активности лизоцима  $y$  от концентрации  $C$  ингибитора АГА.  $h_{+1}$ ,  $h_0$  и  $h_{-1}$  — интенсивности компонентов спектра э.п.р. со значением магнитного квантового числа  $+1$ ,  $0$ ,  $-1$  соответственно. Величина  $Y_{\pm 1}$  принята за 1 при  $C \rightarrow 0$  и за 0 при  $C \rightarrow \infty$ . 1а, 1б, 1в, 2, 3 соответствуют номерам препаратов лизоцима в табл. 1. 5 — кривая связывания лизоцима специфическим ингибитором АГА (9)

в разные стороны на расстоянии не менее 16—18 Å от места непосредственного воздействия ингибитора. Судя по увеличению параметра  $\nu$  в нашем случае, эффект связывания может быть в целом характеризован как разрыхление белковой матрицы. Об этом косвенным образом свидетельствует (17) также тот факт, что изменение энтропии при присоединении АГА составляет  $-11 \div -12$ , в то время, как падение энтропии при комплексообразовании двух частиц при неосложненных условиях, обычно составляет  $-30 \div -60$  э.е. (18-20).

Приведенные результаты можно рассматривать как подтверждение гипотезы индуцированного соответствия (2) и представления о влиянии изменения состояния белковой матрицы на кинетические и термодинамические параметры ферментативных процессов (5, 4, 20).

Институт физиологии и биофизики растений  
Академии наук ТаджССР  
Душанбе

Поступило  
23 IX 1971

Институт химической физики  
Академии наук СССР  
Черноголовка Моск. обл.

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> K. Linderstrom-Long, J. Shellmen, *The Enzymes*, 1, 1959, p. 443.
- <sup>2</sup> D. E. Koshland, K. E. Neet, *Ann. Rev. Biochem.*, 37, 359 (1968).
- <sup>3</sup> М. В. Волкенштейн, *Биофизика ферментов*, «Наука», 1967.
- <sup>4</sup> Г. И. Лихтенштейн, *Биофизика*, 11, 24 (1966).
- <sup>5</sup> R. Lumry, S. Rajender, *Biopolymer*, 9, 1125 (1970).
- <sup>6</sup> Д. Филлис, В сборн. *Химия белка*, М., 1969.
- <sup>7</sup> D. M. Chipman, N. Sharon, *Science*, 165, 454 (1969).
- <sup>8</sup> F. W. Danquist, *M. Am. Raftery, Biochem.*, 7, 3269 (1969).
- <sup>9</sup> Г. И. Лихтенштейн, Ю. Д. Ахмедов, *Молекулярная биология*, 4, 551 (1970).
- <sup>10</sup> Г. И. Лихтенштейн, П. Х. Бободжанов, *Биофизика*, 14, № 4 (1969).
- <sup>11</sup> X. M. Гамильтон, X. M. МакКоннель, *Усп. хим.*, 39, 551 (1970).
- <sup>12</sup> Л. А. Криницкая, Э. Г. Розанцев, М. Б. Нейман, *Изв. АН СССР*, № 1, 115 (1965).
- <sup>13</sup> Н. А. Кравченко, К. А. Каграмонова, Д. Ю. Кузнецов, *Биохимия*, 32, 618 (1967).
- <sup>14</sup> Н. А. Кравченко, Г. В. Клеопина, Е. Д. Каверзиева, *Биохимия*, 30, 195 (1965).
- <sup>15</sup> Н. В. Куликов, Г. И. Лихтенштейн и др., *Биофизика*, 16, № 1 (1971).
- <sup>16</sup> Ю. М. Торчинский, Сульфгидрильные и дисульфидные группы белков, «Наука», 1974, стр. 28.
- <sup>17</sup> C. Vjurgulf, J. Launer, I. Wadso, *Euror. J. Biochem.*, 14, 4752 (1970).
- <sup>18</sup> В. Н. Кондратьев, *Кинетика химических газовых реакций*, Изд. АН СССР, 1958.
- <sup>19</sup> Л. Уэбб, *Ингибиторы ферментов*, М., 1966.
- <sup>20</sup> Г. И. Лихтенштейн, *Успехи биохимии*, 12, 3 (1972).