

Д. С. МАРКОВИЧ, Г. Б. КРАПИВИНСКИЙ,
член-корреспондент АН СССР М. В. ВОЛЬКЕНШТЕЙН

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ДИССОЦИИРУЮЩИХ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ

Важная роль изменений четвертичной структуры в осуществлении регуляции активности ферментов хорошо известна ⁽¹⁾. Кинетика этих изменений представляет большой интерес, поскольку она определяет характер многих функциональных перестроек ферментных систем, в частности, те сравнительно медленные изменения активности ферментов, которые в настоящее время получили название «гистерезисных эффектов» ⁽²⁾. Несмотря на актуальность таких исследований, динамика четвертичной структуры ферментов практически не изучалась. Это объясняется отсутствием достаточно чувствительных и в то же время малоинерционных методов исследования диссоциирующих макромолекулярных систем. Особую трудность для исследования представляют системы, равновесие в которых сдвинуто преимущественно в сторону одной из четвертичных структур, например в сторону тетрамера, как это имеет место *in vivo* для гемоглобина, лактатдегидрогеназы, *D*-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и других белков ⁽³⁾. Целью данной работы было исследование динамики некоторых четвертичных структур белков-ферментов при помощи нового метода, позволяющего: а) обнаружить весьма малое количество диссоциированной формы белка в условиях, когда равновесие в системе сдвинуто в сторону ассоциированной формы, б) следить за кинетикой изменений равновесия как в этом случае, так и при других соотношениях четвертичных структур, в) определить константу скорости диссоциации в состоянии равновесия системы. Основная часть работы выполнена на *D*-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (ГАФД) из мышц свиньи.

В диссоциирующих макромолекулярных системах (например, типа тетрамер $\rightleftharpoons$ димер) * в состоянии равновесия непрерывно с равными скоростями идут процессы ассоциации и диссоциации. Они проявляются, например, в рекомбинации субъединиц между изоферментами H_4 и M_4 ЛДГ, в результате которой появляются гибридные изоферменты ⁽⁴⁾. Возможность использования гибридизации не с целью получения конечных форм (набора изоферментов или модифицированных по определенным субъединицам белков), а для количественного исследования динамики диссоциирующих систем ранее не обсуждалась. Принципиальная особенность предлагаемого подхода состоит в исследовании кинетики гибридизации в диссоциирующей системе, состоящей из одинаковых макромолекул, часть из которых помечена флуоресцентной меткой по всем субъединицам. Для таких исследований необходимо: 1) иметь возможность, не вмешиваясь в равновесие, «пометить» все димеры (или же все субъединицы) в тетрамере, 2) иметь метод, позволяющий отличить метку в димере от метки в тетрамере в силу тонких различий в структуре субъединиц и окружении метки или, лучше того, позволяющий обнаруживать непосредственно взаимодействия самих меток при их сближении в ассоциированных формах молекул. Исползованный нами метод наблюдения за гибридизацией основан на явлении переноса энергии возбуждения по индуктивно-резонансному механизму.

* Здесь и далее мы ограничимся обсуждением этой простой системы, хотя метод исследования в общем виде применим к различным диссоциирующим системам.

нансному механизму между флуоресцентными метками, находящимися на разных субъединицах одной макромолекулы. Условия, при которых эффективна миграция энергии электронного возбуждения, хорошо известны⁽⁵⁾. Поскольку в случае взаимодействия меток ориентация испускающей молекулы (связанного с ней электронного осциллятора) будет отличаться от ориентации молекулы первично поглотившей свет, то анизотропия излучения (или поляризация) уменьшается. В случае диссоциации макромолекулы на субъединицы взаимодействия меток исчезают и поляризация флуоресценции (P) вследствие этого должна возрастать. При смешивании меченых по всем субъединицам и немеченых молекул происходит образование гибридов, в которых резонансные взаимодействия отсутствуют или ослаблены и P также возрастает. Так, в системе тетрамер $\rightleftharpoons$ димер образуются гибриды, содержащие один меченый и один немеченый димер. Нами показано, что из кинетики изменений P в этом случае легко может быть получена константа скорости диссоциации. Использование гибридизации позволяет не прибегать к релаксационным методам и исследовать кинетические параметры системы в состоянии равновесия.

Для получения количественных данных о кинетике в этой системе необходимо соблюдение нескольких условий. Во-первых, желательно, чтобы метки были жестко фиксированы на макромолекуле независимо от состояния четвертичной структуры. Во-вторых, совершенно необходимо, чтобы отношение τ/ρ , где τ — время жизни возбужденного состояния метки, ρ — время вращательной релаксации, было мало, не более 0,01—0,02, чтобы изменения четвертичной структуры не вызывали изменений P из-за изменения времен вращательной релаксации макромолекулы. В-третьих, метки не должны смещать равновесие в диссоциирующей системе. В работе показано, что эти требования могут быть удовлетворены в конкретных случаях.

ГАФД выделяли из скелетных мышц свиньи по методу Элоди⁽⁶⁾. В качестве флуоресцентной метки использовали флуоресцеинмеркурат (ФМА), полученный по методу Карупа⁽⁷⁾. Условия реакции ФМА с SH₁₄₉ ГАФД и SH-группой активного центра ЛДГ описаны ранее⁽⁸⁾. Все исследования проводились в 0,1 *M* трис-буфере при pH 8. Поляризацию флуоресценции (P) измеряли на спектрофлуориметре с поляризационной приставкой.

ФМА специфически взаимодействует с SH-группой активного центра ГАФД в положении 149 от *N* конца, т. е. тетрамер связывает четыре молекулы метки (ГАФД — ФМА₄). Известно, что ГАФД значительно легче распадается на димеры, чем на мономеры⁽⁹⁾. Комплекс ГАФД — ФМА₄ полностью удовлетворяет условиям эффективной миграции энергии и трем вышеизложенным требованиям, ограничивающим применимость нашего метода.

1. Критическое расстояние R_0 по Ферстеру, при котором вероятность миграции равна 0,5, составляет для флуоресцеина 26 Å⁽¹⁰⁾. Спектральные свойства ФМА и флуоресцеина различаются незначительно. Поскольку расстояние между SH₁₄₉ различных центров тетрамера составляет ~25 Å, то имеет место эффективная миграция энергии между метками на этих SH-группах в пределах одного тетрамера. Значения P вследствие миграции уменьшаются от 0,37 при соотношениях ГАФД/ФМА = 1 до 0,25 (4 моля ФМА на тетрамер).

Деполяризация при присоединении от двух до четырех молекул ФМА на тетрамер полностью объясняется резонансными взаимодействиями меток, поскольку показано, что она имеет место при $T/\eta \rightarrow 0$. Другие возможные причины как деполяризации (вторичная флуоресценция, например), так и увеличения поляризации полностью исключены. Работа велась с малыми концентрациями комплексов (~10⁻⁶ *M*), снимались концентрационные зависимости P в широком диапазоне концентраций,

кроме того, в качестве контроля использовали комплекс с соотношением ГАФД/ФМА < 1 , в котором миграция энергии в пределах одной макромолекулы исключена, и в таких же концентрациях по метке, какие имели место в комплексах ГАФД — ФМА₄.

2. Молекулы ФМА жестко фиксированы на макромолекуле, о чем свидетельствуют очень высокие значения поляризации 0,37 при 10°.

3. Время жизни возбужденного состояния τ для ФМА равно 3,5 нсек., а время вращательной релаксации макромолекулы ГАФД $\rho = 200$ нсек., т. е. отношение $\tau/\rho = 0,017$. Поэтому изменения ρ вследствие диссоциации не отражаются заметным образом на значениях P .

4. ФМА не сдвигает существенным образом равновесие в системе тетрамер $\rightleftharpoons$ димер. Были подобраны такие экспериментальные условия, в которых относительные количества тетрамеров и димеров сравнимы (в присутствии $5 \cdot 10^{-3}$ М АТФ) (3). В этих условиях, по данным седиментации, связывание четырех молекул ФМА не вызывает сдвига равновесия.

Известно, что ГАФД при концентрациях выше 0,5 мг/мл находится полностью в тетрамерной форме (3). Тем не менее те небольшие количества диссоциированных форм, которые остаются необнаруженными другими методами, легко выявляются методом гибридизации. На рис. 1 приведены кривые изменения P при добавлении меченого белка к меченому в молярных соотношениях 1:1, 2:1 и 3:1. Как видно из кривых, сразу после добавления меченого белка происходит рост P в течение 20—50 мин. и после чего P не меняется.

Поскольку мы вводим в раствор немеченый белок со свободными SH-группами, то возможно перераспределение метки между макромолекулами, что также может привести к снятию или ослаблению резонансных взаимодействий. Такая возможность была исключена следующим образом: к полностью меченому тетрамеру добавляли немеченый фермент с предварительно алкилированными SH-группами. В этом случае мы наблюдали такие же кривые изменения P . Кроме того, P не изменяется при добавлении в раствор меченого тетрамера ГАФД избытка другого белка — лактатдегидрогеназы, который легко связывает свободные молекулы ФМА.

Выражения, описывающие кинетику гибридизации при смешении разных концентраций меченого и немеченого белков, достаточно сложны, и анализ кинетики требует применения ЭВМ.

Остановимся на более простом выражении, полученном для кинетики гибридизации при отсутствии концентрационных сдвигов равновесия.

Для каждой из форм тетрамера — меченого, немеченого и гибридного можно записать

$$dT/dt = -K_+T + \omega K_-D^2, \quad (1)$$

где T — одна из форм тетрамера, D — общая концентрация димеров, ω — вероятность образования определенной формы тетрамера.

Решение этого уравнения:

$$\ln(-K_+T + \omega K_-D^2) = -K_+t - Y. \quad (2)$$

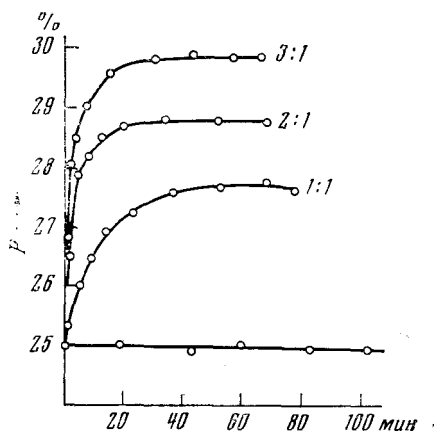


Рис. 1. Кинетика гибридизации комплекса апо-ГАФД — ФМА₄ и апо-ГАФД при различных соотношениях немеченого и меченого фермента. $t = 12^\circ$, трис-НСI буфер, pH 8. Концентрация комплекса 10^{-5} М

При $t = 0$ концентрация гибридного тетрамера $T_r = 0$, концентрация меченого тетрамера $T_m = T_m^0$.

Из граничных условий получаем выражения для Y и, подставляя их, получаем уравнения для кинетики меченых и гибридных тетрамеров:

$$\ln \frac{2\omega T_m^0 - T_m}{T_m^0 (2\omega - 1)} = -K_+ t, \quad (3)$$

$$\ln \left(1 - \frac{T_r}{2\omega T_m^0} \right) = -K_+ t, \quad (4)$$

$$P = \frac{1/2 P^D n^D + 1/3 P^{TM} n^{TM} + P^{TG} n^{TG}}{1/\alpha n^D + 1/\beta n^{TM} + n^{TG}},$$

где α и β — коэффициенты, учитывающие тушение флуоресценции при взаимодействии меток; P^D , P^{TM} , P^{TG} , n^D , n^{TM} , n^{TG} — поляризации и мольные доли димерной, меченой и немеченой тетрамерных форм соответственно.

Значение P для четырех молекул ФМА на тетрамер получить просто, поскольку только четыре SH-группы обладают высокой реакционной способностью. Значение P для двух молекул ФМА получено по методу Вебера⁽¹⁰⁾. Получив из данных P доли каждой из компонент и подставив их в уравнения (3) и (4), определим константу скорости диссоциации

$$K_+ = 10^{-3} \text{ сек}^{-1}.$$

Конечные значения P_k , устанавливающиеся после гибридизации, характеризуют равновесные соотношения трех видов тетрамеров — меченых, немеченых и гибридных. Совпадение экспериментальных значений P_k с расчетными свидетельствует о справедливости предпосылки — гибридизации через димеры без значительного количества мономерной формы.

При смешении меченой по четырем центрам ЛДГ с немеченым ферментом также имеет место гибридизация. В отличие от ГАФД в исследуемых концентрациях гибридизация заканчивалась в течение 1—3 мин. Известно, что изоферменты H₄ и M₄ ЛДГ значительно легче, чем ГАФД, диссоциируют на субъединицы и образуют гибридные изоферменты⁽⁴⁾.

Применяемый в данной работе подход к исследованию четвертичной структуры ферментов представляется нам интересным в двух аспектах. Во-первых, появляется возможность разностороннего изучения кинетики ассоциации и диссоциации ферментов, имеющей столь большое значение в регуляторных процессах на молекулярном уровне. По нашим данным, НАД резко угнетает, а ингибитор АТФ увеличивает скорость гибридизации ГАФД. Во-вторых, по-видимому, константы скоростей ассоциации и диссоциации являются теми параметрами, которые наилучшим образом характеризуют взаимодействия субъединиц в области их контактов, а следовательно, должны быть наиболее чувствительными к проявлениям взаимодействий активных и регуляторных центров, расположенных на разных субъединицах молекулы фермента.

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пущино-на-Оке

Поступило
14 VII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ О. Л. Поляновский, В сборн. Аллостерическая регуляция действия ферментов, М., 1971, стр. 6.
- ² C. Frieden, J. Biol. Chem., **245**, 5788 (1970).
- ³ R. Jasnicke, in: Pyridine Nucleotide Dependent Dehydrogenases, 1970, p. 71.
- ⁴ S. Anderson, G. Weber, Arch. Biochim. Biophys., **116**, 207 (1966).
- ⁵ Th. Förster, Comprehensive Biochem., **22**, 61 (1964).
- ⁶ P. Elödi, N. Szörenyi, Acta Physiol. Hung., **9**, 339 (1956).
- ⁷ F. Karush et al., Anal. Biochem., **9**, 100 (1964).
- ⁸ Д. С. Маркович, Н. В. Умрихина, М. В. Волькенштейн, Мол. биол., **5**, 51 (1971).
- ⁹ S. Constantinidies, W. Deal, J. Biol. Chem., **224**, 4253 (1969).
- ¹⁰ П. П. Феофилов, Б. Я. Свешников, ЖЭТФ, **10**, 1372 (1940).