

УДК 547.96

ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ ПЕРЕСТРОЕК В ЛИЗОЦИМЕ БАКТЕРИОФАГА Т4 ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С ИНГИБИТОРОМ

А. В. ТРОИЦКИЙ *, Ю. Н. ЧИРГАДЗЕ и Е. В. БРАЖНИКОВ

Институт белка АН СССР, Пушкино, Московская область

Исследованы структурные изменения лизоцима бактериофага Т4 при связывании с ингибитором дисахарид-тетрапептидом N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмураминил-L-аланил-γ-D-глутаминил-мезодиаминопимелил-D-аланином из клеточной стенки *Escherichia coli*. При связывании ингибитора с белком происходит уменьшение степени спиральности приблизительно на 14%, регистрируемое методом кругового дихроизма. Обнаружено также изменение оптических свойств остатков триптофана, тирозина и фенилаланина, регистрируемое методами ультрафиолетовой разностной и флуоресцентной спектроскопии. На основании полученных данных и сравнительного анализа пространственных структур фагового лизоцима и лизоцима из белка куриного яйца рассмотрен структурный аспект модели функционирования лизоцима фага Т4. Предложенная модель объясняет различие в специфичности действия лизоцимов бактериофага Т4 и курицы и определяет назначение «лишней» части фагового лизоцима. На первой стадии связывания пептидная часть субстрата контактирует с «верхней» по отношению к щели частью молекулы белка (остатки 106—116 и 135—140). Вследствие этого на втором этапе происходит перестройка молекулы с раскрытием щели, в результате чего становится возможным доступ полисахаридной части субстрата к области каталитического центра и осуществляется гидролиз β(1→4)-гликозидной связи.

Лизоцим бактериофага Т4 синтезируется в зараженной фагом клетке и участвует в лизисе бактерий в конце латентного периода. Этот фермент, как и лизоцимы животного происхождения, является эндо-N-ацетилмурамидгликаногидролазой, т. е. гидролизует β(1→4)-связь между остатками N-ацетилмурамовой кислоты (N-АМ) и N-ацетилглюкозамина (N-АГ) в пептидогликане клеточной стенки. Однако аминокислотная последовательность лизоцима фага Т4 не имеет ничего общего с последовательностями лизоцимов позвоночных животных. Тем не менее пространственные структуры лизоцимов фага Т4 [1—3] и курицы [4—6], хотя и имеют ряд важных различий, во многом сходны [7, 8]. Ингибиторами лизоцима фага Т4 являются гликопептиды из клеточных стенок бактерий [9, 10], в то время как для куриного лизоцима наличие в ингибиторе пептидного «хвоста» не является необходимым [4]. Мэтьюз и Ремингтон предположили, что в фаговом лизоциме каталитический центр образован остатками С1u 11 и Asp 20, однако в пространственной модели белка они стерически недоступны для субстрата. Это позволило им высказать предположение, что при функционировании должны происходить достаточно большие структурные перестройки молекулы фермента [1].

Мы предприняли данную работу с целью экспериментальной проверки этого предположения и обнаружили конформационные изменения в

* Настоящий адрес: Лаборатория молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского МГУ, Москва.

лизоциме фага Т4 при взаимодействии с одним из ингибиторов. Используя также и другие известные в настоящее время данные, мы попытались дать им структурную интерпретацию.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Лизоцим бактериофага Т4 выделяли из 80-литровых порций фаголизата [11, 12]. Чистоту фермента проверяли электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии DS-Na. Концентрацию фермента определяли по поглощению $A_{1\%}^{1\text{см}} = 12,8$ при длине волны 280 нм [11].

Пептидогликан выделяли из целых клеток *Escherichia coli* обработкой горячим DS-Na [13, 14]. Обработка ферментами была исключена. Выделенный пептидогликан гидролизвали лизоцимом из белка куриного яйца в 0,03 М NH_4CO_3 , гидролизат диализовали против воды, и ДСТП* очищали из сконцентрированной диализной жидкости гель-фильтрацией через биогель Р4 и хроматографией на бумаге в системе бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5, верхняя фаза). ДСТП идентифицировали на основании его хроматографических свойств и аминокислотного состава [15]. Полученный препарат был гомогенен при хроматографии на бумаге в системе изомасляная кислота — аммиак — вода (66 : 1 : 33) и электрофорезе на бумаге. Концентрацию ДСТП определяли взвешиванием.

Активность фагового лизоцима определяли по падению мутности суспензии лиофилизированных клеток *Micrococcus lysodeikticus* [16]. Кинетические измерения проводили на ультрафиолетовом спектрофотометре Hitachi 124 (Япония) при 450 нм. Кюветы образца и сравнения содержали по 2,5 мл суспензии бактерий в фосфатном буфере (рН 7,2, ионная сила 0,05) и были термостатированы при 25°. Раствор лизоцима добавляли микрошприцем в кювету сравнения. Скорость лизиса определяли по наклону кривой.

Разностные спектры снимали по четырехкюветной схеме [17] на спектрофотометре Acta VI («Beckman», США). Вся шкала самописца составляла 0,02 или 0,05 ед. оптической плотности. Раствор ДСТП добавляли непосредственно в кюветы. Кювета, в которой были ДСТП и белок, находилась в канале для образца. Концентрация фагового лизоцима составляла 0,052—0,055 мМ, а ДСТП — 0,026—0,256 мМ, что соответствует молярному отношению ингибитор/фермент 0,48—4,77.

Флуоресцентные измерения проводили на установке с монохроматическим возбуждением (линия ртути 296,7 нм), сконструированной в Институте биофизики АН СССР. Регистрацию флуоресценции проводили с передней поверхности кюветы под углом 20° к падающему пучку. Спектры были скорректированы на спектральную чувствительность установки. Концентрация фагового лизоцима составляла 0,028 мМ, а ДСТП — 0,02—0,2 мМ, что соответствует молярному соотношению ингибитор/фермент 0,71—7,14.

Константу связывания по разностным спектрам определяли следующим образом. Значение $K_{\text{связ}}$ в первом приближении вычисляли, используя зависимость $\lg \Delta A / (\Delta A_{\infty} - \Delta A)$ от $\lg [I_0]$, где ΔA_{∞} — разностная оптическая плотность при насыщении фермента ингибитором, а $[I_0]$ — общая концентрация ингибитора. ΔA_{∞} находили по графику зависимости $1/\Delta A$ от $1/[I_0]$ [18]. Уточненное значение $K_{\text{связ}}$ определяли, как описано в работе [19]. Используя затем значение ΔA_{∞} , равное ΔA при $[EI]/[E_0] = 1$ (где $[EI]$ — концентрация комплекса фермент — ингибитор), из графика зависимости $\lg \Delta A / (\Delta A_{\infty} - \Delta A)$ от $\lg [I]$ ($[I]$ — концентрация несвязавшегося субстрата) находили окончательное значение $K_{\text{связ}}$. Константу связывания по спектрам флуоресценции определяли аналогичным способом.

Спектры кругового дихроизма измеряли на дихрографе J-41A, а также на спектрополяриметре ORD/UV-5 с приставкой кругового дихроизма (фирма «Jasco», Япония). Приборы калибровали по *d*-10, камфорсульфоокислоте, по величине эллиптичности при длине волны около 290 нм [20]. Измерения проводили в кюветах толщиной 0,5, 1 и 2 мм. Степень спиральности определяли, как описано в работе [21]. Концентрация фагового лизоцима составляла 0,003—0,006 мМ, а ДСТП — 0,02—0,04 мМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ингибирование лизиса клеток лизоцимом фага Т4 дисахарид-тетрапептидом. Ферментативный лизис бактериальных клеток является реакцией, протекающей в гетерогенной системе. Падение мутности бактериальной суспензии, наблюдаемое в ходе лизиса, непростым образом связано с уменьшением количества субстрата. Ранее была показана применимость кинетики Михаэлиса для описания процесса падения мутности

* ДСТП — дисахарид-тетрапептид, имеется в виду N-АГ-N-АМ-L-Ala-γ-D-Glu-m-DAP-D-Ala; здесь N-АМ — N-ацетилглюкозаминил, N-АГ — N-ацетилмураминил, m-DAP — мезо-диаминопимелил.

в ходе лизиса *M. lysodeikticus* лизоцимами из белка куриного яйца и человека [22, 23]. В предварительных опытах нами была изучена возможность применения уравнения Михаэлиса для описания лизиса бактерий лизоцимом фага Т4 по результатам турбидиметрических измерений. При концентрации фагового лизоцима 0,08—1,30 мкг/мл и концентрации субстрата 0,09—0,32 ед. А/мл зависимость начальной скорости v_0 от концентрации фермента является линейной. Представление данных в координатах Лайнуивера — Берка позволяет определить $K_m = 12,5$ мг/л и $K_{кат} = 2,0 \cdot 10^{-6}$ мг \cdot с $^{-1}$ \cdot М $^{-1}$. ДСП уменьшает скорость падения мутности

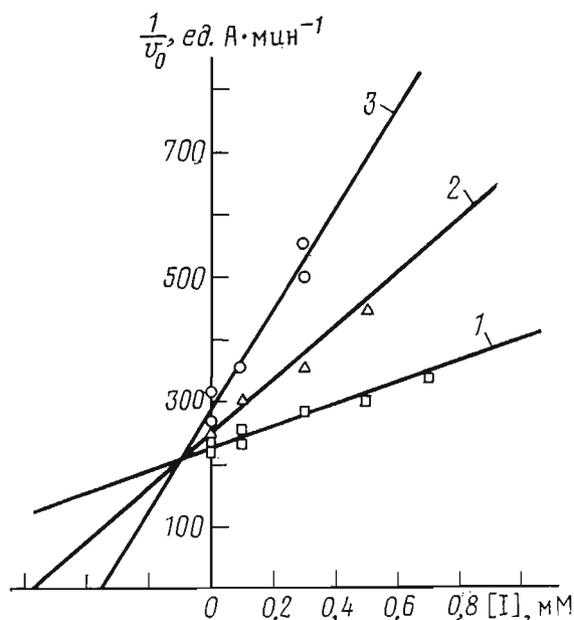


Рис. 1. Зависимость обратной величины начальной скорости падения мутности v_0 при лизисе клеток *M. lysodeikticus* лизоцимом фага Т4 от концентрации дисахарид-тетрапептида. Измерения проведены в фосфатном буфере, рН 7,2, ионная сила 0,05. Концентрация фермента $1 \cdot 10^{-9}$ М, концентрация субстрата (мг/мл) — 0,026 (1), 0,015 (2) и 0,007 (3)

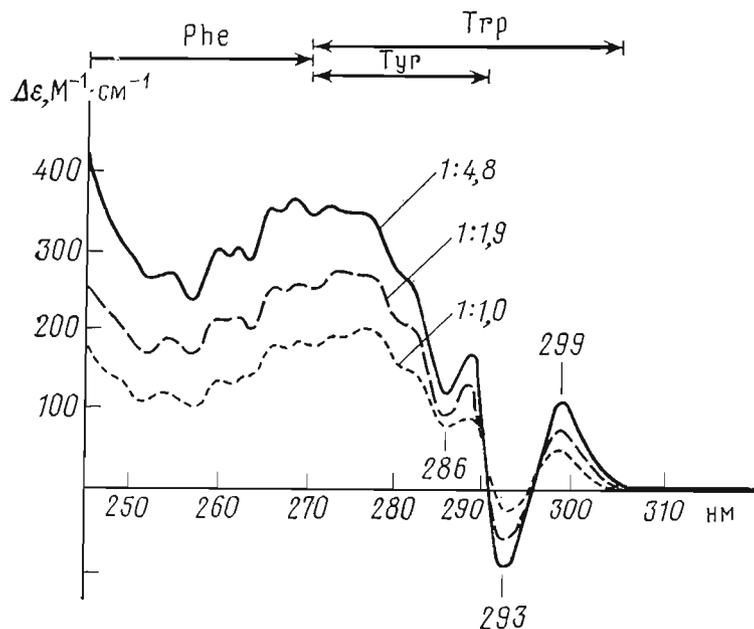


Рис. 2. Разностные ультрафиолетовые спектры при титровании лизоцима фага Т4 дисахарид-тетрапептидом в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,4, содержащем $5 \cdot 10^{-4}$ М дитиозритрит. Концентрация фермента — $5,5 \cdot 10^{-5}$ М. Фермент в смеси с дисахарид-тетрапептидом находился в канале для образца. На рисунке рядом с каждой кривой указано молярное соотношение белок/ингибитор

суспензии клеток *M. lysodeikticus* под действием фагового лизоцима. Обработка данных в координатах Диксона показывает, что он является конкурентным ингибитором лизоцима фага Т4 с константой ингибирования $K_i = 1 \cdot 10^{-4}$ М (рис. 1). Это значение близко к соответствующей величине, найденной Йенсенем с сотр. [9].

Исследование взаимодействия лизоцима фага Т4 с ингибитором методами разностной УФ-спектроскопии и флуоресценции. При взаимодействии лизоцима бактериофага Т4 с ингибитором наблюдаются изменения в ультрафиолетовой области спектра от 250 до 310 нм, где находятся

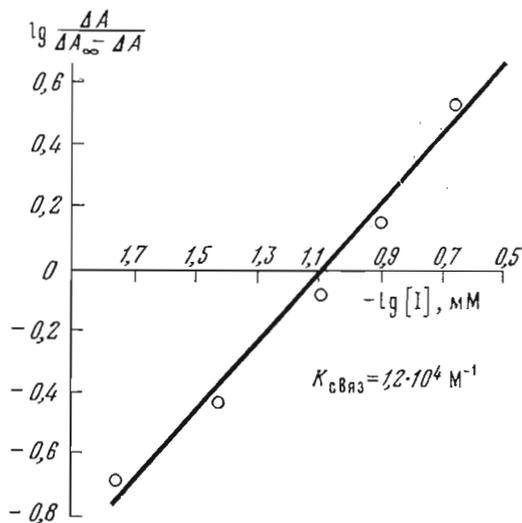


Рис. 3

Рис. 3. Определение константы связывания дисахарид-тетрапептида с фаговым лизоцимом по разностным спектрам

Измерения проведены в фосфатном буфере, рН 7,4, с ионной силой 0,05, содержащем $5 \cdot 10^{-4}$ М дитиотреитол. $\Delta A = \Delta A_{299} - \Delta A_{293}$ — разностная оптическая плотность в присутствии данной концентрации ингибитора, ΔA_{∞} — разностная оптическая плотность при насыщающей концентрации ингибитора

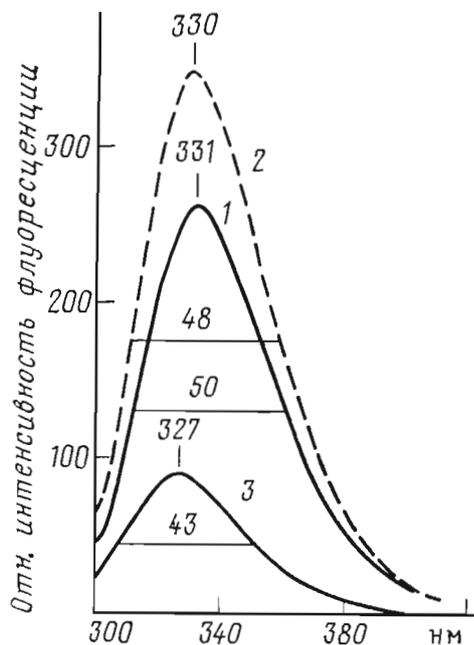


Рис. 4

Рис. 4. Спектры флуоресценции свободного лизоцима фага Т4 (1) и в присутствии ингибитора (2), фосфатный буфер, рН 7,4, с ионной силой 0,05, содержащий $5 \cdot 10^{-4}$ М дитиотреитол

Концентрация фермента — $2,8 \cdot 10^{-5}$ М, концентрация ингибитора — $2 \cdot 10^{-4}$ М; 3 — разностный спектр, полученный вычитанием кривой 1 из 2

электронные переходы остатков ароматических аминокислот. Разностные спектры, полученные при титровании фермента ингибитором, представлены на рис. 2. Константа связывания была определена по изменению разностной оптической плотности при длинах волн 299 и 293 нм, $K_{связ} = 1,2 \cdot 10^4$ М⁻¹ (рис. 3). Соответствующая величина свободной энергии связывания $\Delta F_{связ}^{\circ} = -RT \ln K = -5,5$ ккал/моль. Разностный УФ-спектр имеет сложную форму и обусловлен как сдвигом полос поглощения ароматических хромофоров, так и изменениями их интенсивности. Две самые длинноволновые полосы относятся к электронным переходам только триптофановых остатков. Положительная полоса при 299 нм обусловлена увеличением отрицательного заряда вблизи боковой группы остатка триптофана [24—26], а отрицательная полоса при 293 нм — переходом остатков триптофана в более полярное окружение [27, 28].

Спектр флуоресценции Т4 лизоцима при возбуждении светом с длиной волны 297 нм, т. е. в условиях, когда флуоресценция белка обусловлена только остатками триптофанов, имеет максимум при 331 нм и полуши-

рину 50 нм (рис. 4). Такой коротковолновый максимум эмиссии свойствен остаткам триптофана, недоступным для молекул растворителя [29, 30]. При добавлении ДСТП происходит увеличение квантового выхода триптофановой флуоресценции и небольшое, на 1—2 нм, смещение максимума в коротковолновую область. Это смещение хорошо видно по изменению положения разностного спектра относительно спектра флуоресценции свободного фермента, а также по изменению отношения интенсивности флуоресценции на плечах спектра. Разностный спектр, полученный вычитанием спектра флуоресценции белка с ингибитором из спектра свободного фермента, имеет максимум при 327 нм и полуширину 43 нм. Этот результат свидетельствует о том, что триптофановые остатки

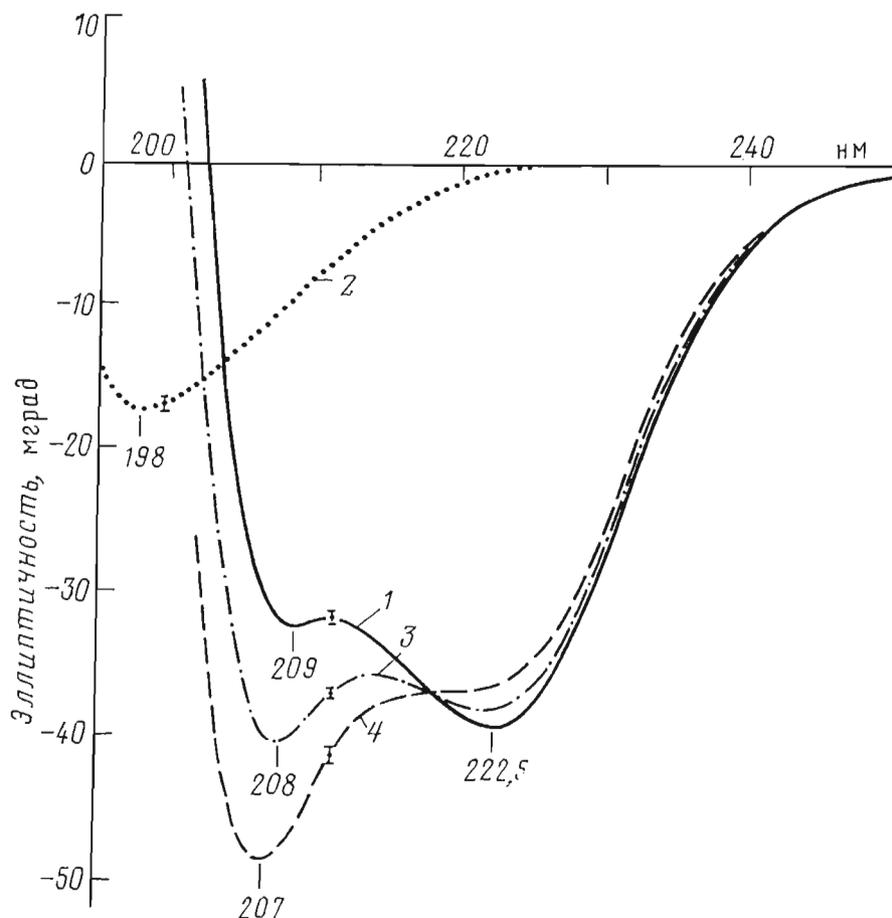


Рис. 5. Экспериментальные спектры кругового дихроизма свободного фагового лизоцима в концентрации 0,006 мМ (1), ингибитора в концентрации 0,02 мМ (2), смесей фермент — ингибитор, молярное соотношение 1 : 3,3 (3) и 1 : 6,6 (4)

Все растворы в фосфатном буфере, рН 7,4, с ионной силой 0,05, $2 \cdot 10^{-4}$ М дитиотреитол. Длина оптического пути кюветы — 2 мм

становятся еще более недоступными растворителю. Константа связывания лизоцима фага Т4 с ДСТП, определенная по изменению интенсивности флуоресценции при титровании фермента ингибитором, равна $1,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, свободная энергия связывания $\Delta F^\circ_{\text{связ}} = -5,7$ ккал/моль. Полученные величины близки к определенным по разностным спектрам фагового лизоцима с ингибитором и соответствуют значению константы ингибирования, определенной по падению мутности суспензии клеток *M. lysodeikticus*.

Таким образом, при связывании фагового лизоцима с ДСТП в молекуле фермента происходят конформационные изменения, затрагивающие остатки всех трех типов ароматических хромофоров — триптофана, тирозина и фенилаланина. Сопоставление данных разностной ультрафиолетовой и флуоресцентной спектроскопии позволяет заключить, что меняется состояние по крайней мере двух остатков триптофана из трех, име-

ющихся в молекуле фермента. Рассмотрение локализации ароматических остатков на модели фагового лизоцима позволяет прийти к заключению, что конформационные перестройки затрагивают удаленные друг от друга участки молекулы. Более детальный анализ флуоресцентных свойств лизоцима фага Т4 и подробная аргументация этого вывода будут представлены в отдельном сообщении.

Изменение вторичной структуры лизоцима фага Т4 при связывании с ингибитором. При добавлении ДСТП к раствору фагового лизоцима происходит изменение спектра кругового дихроизма (КД) по амплитуде, соответствующее уменьшение спирального содержания. На рис. 5 пред-

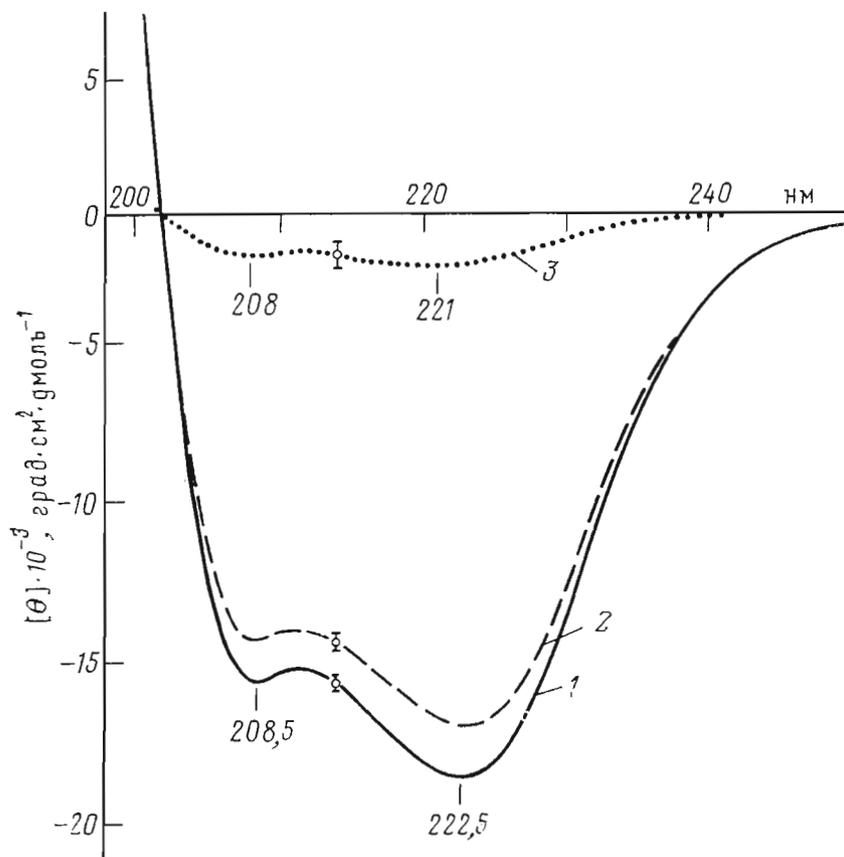


Рис. 6. Спектры кругового дихроизма свободного фагового лизоцима (1) и в присутствии ингибитора, молярное соотношение фермент — ингибитор 1 : 6,6 (2)

Концентрация фермента 0,006 мМ, ингибитора — 0,04 мМ; 3 — разностный спектр, полученный вычитанием одной кривой из другой. Состав растворителя указан в подписи к рис. 5

ставлены экспериментально полученные на дихрографе J-41A спектры фагового лизоцима, ДСТП и их смеси (при двух разных концентрациях ДСТП). Уменьшение дихроичного поглощения белка хорошо видно в области 225—235 нм, где отсутствует вклад, вносимый ДСТП. Уменьшение поглощения, вызванное разбавлением раствора белка при добавлении ингибитора, незначительно и составляет 1 и 2%. Ошибка измерения, обусловленная шумом, составляет не более 2% от максимального значения при 222,5 нм.

На рис. 6 представлены спектры КД свободного фагового лизоцима и после добавления ДСТП с учетом вклада ингибитора и разбавления. Приведенные кривые являются средними для нескольких измерений, проведенных в кюветах с разными длинами оптического пути. В верхней части рисунка показан разностный спектр, полученный арифметическим вычитанием спектров КД фагового лизоцима в отсутствие и в присутствии ингибитора (молярное соотношение белок/ингибитор 1 : 6,6). Анало-

личные изменения спектров КД лизоцима фага Т4 были зарегистрированы и при другой концентрации фермента (0,003 мМ), а также на менее чувствительном приборе (ORD/UV-5) с использованием другого образца ДСТП при концентрации фермента 0,02 мМ и при молярном соотношении ингибитор/белок, равном 12,4 : 1.

Принимая константу связывания фагового лизоцима с ДСТП равной $1,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, можно рассчитать, какая доля фермента входит в состав комплекса с ингибитором при тех концентрациях фермента и ингибитора, которые были использованы при снятии спектров КД. Расчет показывает, что эта доля составляет 22% (при $[I_0]=0,02 \text{ мМ}$) и 37% (при $[I_0]=0,04 \text{ мМ}$). Используя эти величины, нашли, что при насыщении фермента ингибитором степень α -спиральности уменьшается приблизительно на 14%.

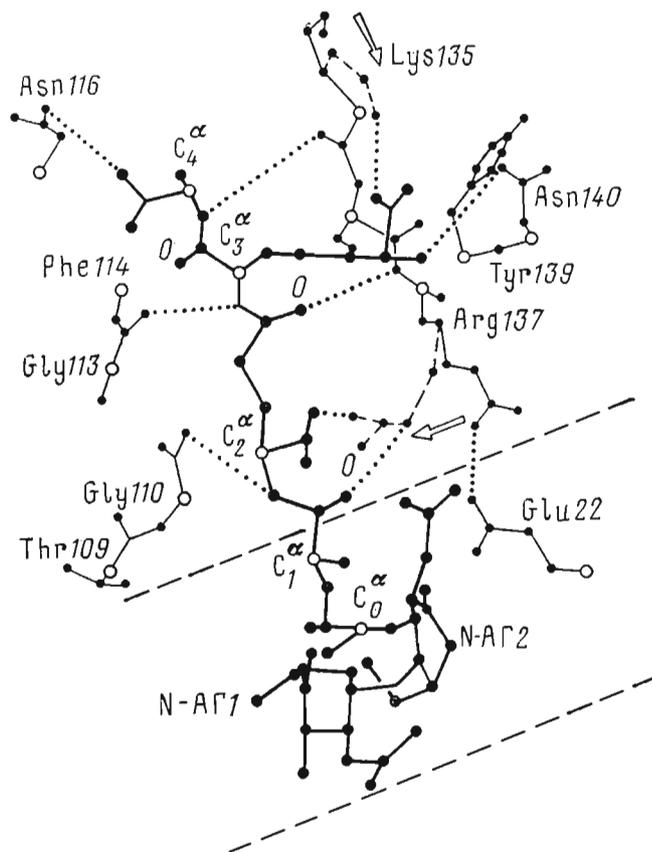


Рис. 7. Локализация ингибитора на молекуле лизоцима бактериофага Т4. Пунктиром указаны полярные контакты. α -Углеродные атомы остатков пептидной части ингибитора вслед за C_0^α остатка молочной кислоты пронумерованы в следующем порядке: L-Ala, D-Glu, m-DAP и D-Ala. Дисахарид расположен в щели белковой молекулы. Координаты атомов для фагового лизоцима взяты из работы [2]. Стрелками указаны изменения в конформации боковых групп белка при образовании некоторых солевых связей

Следует заметить, что Йенсен с сотр. не обнаружили изменений флуоресценции и пептидного КД лизоцима фага Т4 при его взаимодействии с дисахарид-трипептидом — близким по структуре конкурентным ингибитором, отличающимся от ДСТП отсутствием конечного остатка D-аланина [9]. Мы нашли, что этот ингибитор вызывает сходные с индуцируемыми ДСТП изменения спектра КД, а также УФ и флуоресцентных спектров лизоцима фага Т4. Причины различий данных Йенсена с сотр. и результатов настоящей работы нам не совсем ясны. Можно отметить, что использованные нами препараты ингибиторов имели в несколько раз большую эллиптичность в области 200—220 нм. Не совсем понятна также

Таблица 1

Контакты, возникающие между пептидной частью ингибитора и лизоцимом фага Т4 при связывании

Ингибитор	Лизоцим фага Т4	Связь
L-Ala — C'O	Arg 137 — N ^ε H	Водородная
D-Glu — N'H	Gly 110 — C'O	»
D-Glu — C ^β 1O	Arg 137 — N ^η H	Солевая
D-Glu — C ^δ O ^ε	Arg 137 — N'H	Водородная
D-Glu — C ^β H ₂	Met 106 — C ^ε H ₃	Гидрофобная
D-Glu — C ^γ H ₂	{ Phe 114 — C ^γ H, C ^δ H	»
	{ Gly 113 — C ^α H	»
m-DAP — N'H	Gly 113 — C'O	Водородная
m-DAP — C ^β H ₂	Ser 136 — C ^α H	Гидрофобная
m-DAP — C ^ε O ^η	Lys 135 — N ^ε H	Солевая
m-DAP — N ^ε H	Asn 140 — C ^γ O ^δ	Водородная
D-Ala — N'H	Lys 135 — C'O	»
D-Ala — C'O	Asn 116 — N ^δ H	»

Таблица 2

Список координат атомов ингибитора лизоцима фага Т4 дисахарид-тетрапептида N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмураминил-L-аланил-γ-D-глутаминил-мезо-диаминопимелинил-D-аланина в составе комплекса фермент — ингибитор

Атомы	Координаты атомов, Å			Атомы	Координаты атомов, Å			
	x	y	z		x	y	z	
N-AG1	O4	35,0	-1,0	11,0	L-Ala N	35,5	0,0	8,5
	C1	36,5	0,0	12,0	CA	35,0	1,0	7,5
	C2	36,5	0,0	13,5	C	35,0	1,0	6,0
	C3	35,0	0,0	13,5	O	36,0	0,5	5,5
	C4	35,0	0,0	12,0	CB	36,0	2,5	7,5
	C5	35,0	1,5	11,5	D-Gln N	33,5	1,0	5,5
	O5	36,5	1,5	11,5	CA	33,0	2,0	4,0
	C6	34,0	2,5	12,0	CB	33,0	1,0	2,5
	O6	33,0	2,0	12,5	CG	32,0	1,5	1,0
	N2	36,5	1,0	14,5	C	33,0	2,0	-0,5
	C7	38,0	2,0	14,5	O	34,0	2,0	-1,0
	O7	39,0	2,0	13,5	CB1	34,0	3,5	3,5
	C8	37,5	3,0	15,5	OG1	34,5	3,5	2,5
	O3	35,0	0,0	15,0	OG2	34,5	4,0	4,5
O1	38,0	0,0	12,0	m-DAP N	32,0	2,5	-1,0	
N-AG2	C1	39,0	-3,0	9,5	CA	32,0	3,0	-2,0
	C2	38,5	-2,0	9,0	C	30,5	3,5	-3,0
	C3	39,0	-0,5	9,5	O	29,5	4,5	-2,5
	C4	39,0	-0,5	11,0	CB	33,0	3,0	-3,0
	C5	39,5	-2,0	12,0	CG	34,5	3,5	-3,0
	O5	40,0	-3,0	10,5	CD	35,5	3,0	-3,0
	C6	38,0	-3,0	12,5	CE	37,0	3,5	-3,0
	O6	37,0	-3,5	11,0	NZ	38,5	3,0	-3,0
	N2	39,0	-2,0	7,5	CZ1	37,0	3,5	-4,5
	C7	39,0	-2,0	6,0	OEE1	36,5	4,5	-5,0
	O7	38,0	-1,0	5,5	OEE2	37,5	2,5	-5,5
	C8	40,0	-2,5	5,0	D-Ala N	30,5	2,5	-4,0
	O3	38,0	0,0	10,0	CA	30,0	2,5	-5,0
	O1	39,0	-4,0	8,5	C	28,5	2,0	-4,5
D-Lac	CA	36,5	-1,0	10,0	CB	29,5	4,0	-5,5
	C	35,5	0,0	10,0	O1	27,5	1,5	-5,5
	O	35,0	1,5	10,0	O2	28,0	2,5	-3,5
	CB	35,5	-2,0	11,0				

Примечание. Система декартовых осей совпадает с таковой для лизоцима фага Т4, определенной в работе [2]. Остаток N-AM представлен в виде суммы остатка N-AG и остатка молочной кислоты (Lac).

природа компонентов с положительной эллиптичностью в спектрах КД ингибитора при $\lambda > 220$ нм и фагового лизоцима при $\lambda > 240$ нм, приведенных в работе [9]. По нашим данным [31], совпадающим с данными других исследователей [32], эллиптичность фагового лизоцима равна нулю при 257 нм, тогда как в работе [9] она равна нулю при 240 нм. Проведя арифметическое суммирование спектров КД лизоцима фага Т4 и ингибитора, приведенных Йенсенем с сотр., мы не смогли получить результирующую кривую, совпадающую с приведенной в работе [9], что позволяет сомневаться в правильности обработки и интерпретации спектров КД, полученных этими авторами.

Определение возможного места связывания лизоцима фага Т4 с ингибитором с помощью молекулярных моделей. Для определения возможного места связывания фагового лизоцима с ДСТП была изучена топография поверхности молекулы лизоцима фага Т4. С этой целью по координатам атомов, полученным в результате рентгеноструктурного анализа с ошибкой 0,4 Å [2, 3], был построен значительный фрагмент молекулы фагового лизоцима, включающий область предполагаемого активного центра, а также собрана модель ДСТП.

Главная цепь белка была построена из скелетных моделей, а боковые группы — из объемных моделей Курто в масштабе 1 Å = 2 см. Модель ДСТП собирали целиком из объемных моделей Курто. Углеводную часть ингибитора локализовали в щели между доменами молекулы фагового лизоцима, как это было предложено Россманом и Аргосом для лактона тетра-*N*-ацетилхитотетраозы по аналогии с местом его посадки в яичном лизоциме [7]. В том случае, если пептид направлен приблизительно перпендикулярно щели и ложится на поверхность «верхнего» домена в области между тремя спиралями F 115—123, G 129—134 и H 137—141, наблюдается хорошее стерическое соответствие поверхностей пептидной части ингибитора и молекулы фагового лизоцима. Детальную конформацию ингибитора выбирали, исходя из условий максимального насыщения водородных и солевых связей, а также гидрофобных контактов между пептидной частью ингибитора и поверхностью молекулы белка. Проекция ингибитора в составе комплекса и полярные контакты приведены на рис. 7, а полный список возникающих контактов — в табл. 1. Для образования некоторых солевых связей требуются повороты боковых групп остатков Lys 135 и Arg 137. Координаты атомов ДСТП, снятые с модели комплекса фермент-ингибитор, приведены в табл. 2. Средняя ошибка в определении этих координат, определенная по отклонению длин связей от их нормальных значений, составляет 0,3 Å. (Приводя значения координат атомов ингибитора, полученных таким образом, мы лишь преследуем цель дать возможность воспроизведения построенной нами модели комплекса.) Координаты центров сахарных колец практически совпадают с указанными в работе Россмана и Аргоса [7].

Структурная модель функционирования лизоцима фага Т4. Третичные структуры фагового и куриного лизоцимов значительно различаются [1, 3, 6]. Однако детальный анализ пространственной топологии двух ферментов показал, что многие участки двух лизоцимов структурно эквивалентны [7, 8]. Была обнаружена гомология в пространственном расположении 78 C^α-атомов обеих молекул. (Куриный лизоцим состоит из 129 аминокислотных остатков, фаговый — из 164 остатков.) При этом гомология хода полипептидных цепей не сопровождается сходством характера аминокислотных остатков, занимающих эквивалентные положения. Аминокислотные последовательности лизоцимов фага Т4 и курицы совершенно различны. Фаговый лизоцим не содержит дисульфидных связей и имеет 35 «лишних» аминокислотных остатков по сравнению с куриным. Оба белка состоят из двух доменов, разделенных щелью. «Лишние» остатки фагового лизоцима представлены в основном в виде единого фрагмента полипептидной цепи, за счет которого «верхний» домен лизоцима фага

Т4 значительно крупнее. Схематически молекула лизоцима фага Т4 представлена на рис. 8. Эта схема составлена по данным работы [1] и относится к структуре молекулы в кристалле. У лизоцима из белка куриного яйца щель между доменами является местом связывания сахарных остатков молекулы субстрата (центры связывания А—F). Расщепление субстрата происходит по гликозидной связи между остатками D и E [6]. По аналогии и исходя из общих соображений, Рассман и Аргос предположили, что и у фагового лизоцима щель является областью активного центра. Однако у фагового лизоцима эта щель с одного конца значительно более открыта (в участках, соответствующих центрам связывания А, В и С куриного лизоцима), а с другого — наоборот, замкнута. Фрагменты основной цепи и боковые цепи аминокислотных остатков 20—23 снизу и 137—142 сверху формируют канал в молекуле фагового лизоцима.

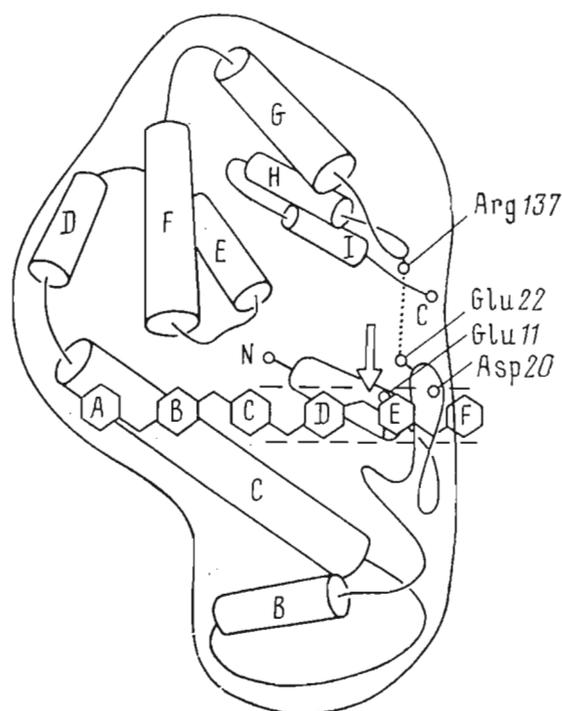


Рис. 8. Схема пространственной структуры молекулы лизоцима Т4, составленная по данным Мэтьюза и сотр. [1, 3] α -Спиральные участки молекулы изображены цилиндрами соответствующей длины. Стрелкой обозначено место разрыва полисахаридной цепи при каталитическом акте. Предполагаемые каталитические остатки — Glu 11 и Asp 20. Пунктиром обозначена солевая связь между остатками Arg 137 и Glu 22

Предполагаемые каталитические остатки Glu 11 и Asp 20 находятся на противоположных краях щели. Ясно, что ни линейный полисахарид, ни тем более природный нерастворимый субстрат — пептидогликан бактериальной стенки — не могут в этом случае занять место в активной щели. Более того, даже если бы это случилось, то контакты сахарных остатков А, В и С с молекулой фермента были бы ослаблены.

Фаговый лизоцим в отличие от куриного не обладает хитиназными свойствами, не ингибируется хитоолигосахаридами и гидролизует пептидогликан лишь по остаткам N-ацетилмурамовой кислоты, связанным с пептидами [10]. Хитоолигосахаридами не вызываются изменений спектров флуоресценции, ИК и КД лизоцима фага Т4 [33]. В то же время ДСТП хорошо связывается с фаговым лизоцимом и является его конкурентным ингибитором. Отсюда можно сделать вывод, что при образовании фермент-субстратного комплекса с фаговым лизоцимом в первую очередь взаимодействует пептидная часть субстрата.

Анализ молекулярных моделей выявил высокую степень комплементарности пептидной части ДСТП и «верхнего» домена молекулы фермента. Это позволяет заключить, что избыточная по сравнению с куриным лизоцимом часть молекулы фагового лизоцима служит для связывания пептидных участков пептидогликана бактериальной стенки.

При взаимодействии с ингибитором существенные повороты претерпевают боковые группы Arg 137 и Lys 135, которые образуют солевые связи с соответствующими карбоксильными группами остатков D-глутаминовой и мезо-диаминопимелиновой кислот пептида (рис. 7). α -Карбоксильная группа D-Glu является особо важной, поскольку ее блокирование приводит к потере у соответствующего гликопептида ингибирующего действия [9].

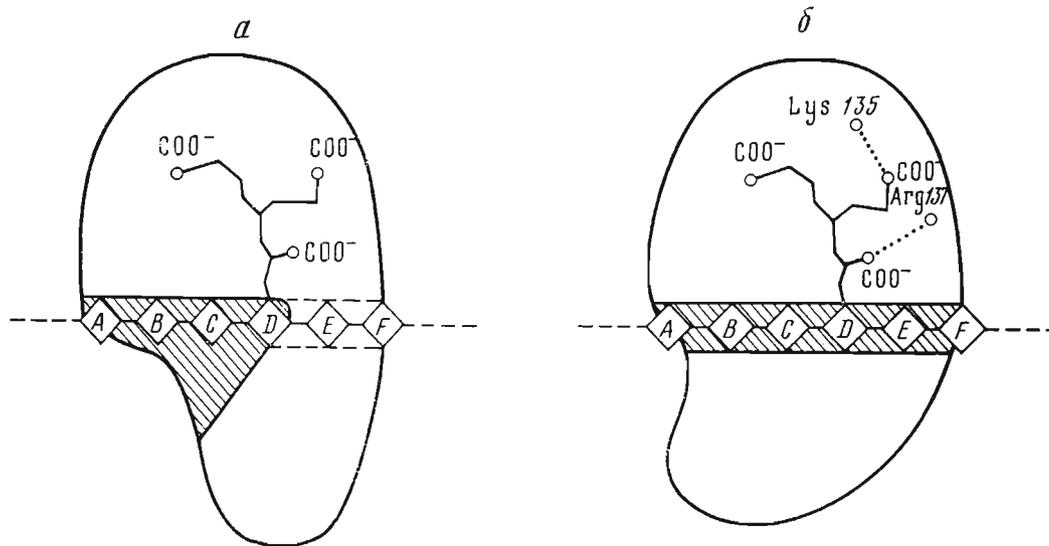


Рис. 9. Схема двух этапов взаимодействия пептидогликана с лизоцимом фага Т4 при образовании фермен-субстратного комплекса

a — первый этап: пептидный «хвост» связывается с верхним доменом, щель в области расположения сахарных колец *D*, *E* и *F* закрыта; *b* — второй этап: конформационные изменения в ферменте, вызванные посадкой пептидного «хвоста», приводят к раскрытию щели в области колец *D*, *E* и *F*, тем самым обеспечивается их доступ к каталитическому центру фагового лизоцима; одновременно происходит смыкание щели в области колец *A*, *B* и *C*, приводящее к хорошим контактам этих сахарных колец с молекулой фермента

Для эффективного связывания ингибитора с ферментом совершенно необходимым является трипептид, содержащий остатки D-молочной кислоты, L-аланина и D-глутаминовой кислоты. В свободном ферменте гуанидиновая группа Arg 137 «верхнего» домена взаимодействует с карбоксилем Asp 20, лежащего на противоположном краю щели в «нижнем» домене. При этом, очевидно, образуется солевая связь. Эта солевая связь, по-видимому, весьма существенна для поддержания конформации щели в замкнутом состоянии, однако и в ее отсутствие щель в этой части молекулы слишком узка. Взаимодействие пептида с «верхним» доменом вызывает, по всей вероятности, разрушение этой связи, облегчающей раскрытие щели, а также приводит к конформационным изменениям в молекуле фагового лизоцима, которые в конечном счете и обеспечивают связывание ферментом углеводной части пептидогликана. Эти перестройки регистрируются различными оптическими методами. Результатом таких конформационных перестроек должно являться раскрытие щели в области сахарных остатков *D* и *E* и сужение щели в области остатков *A*, *B* и *C*. Одним из мыслимых вариантов таких перестроек является деформация длинной спирали *C*, соединяющей два домена. Этим обеспечивается изменение взаимной ориентации доменов, выражающееся в сужении щели на одном краю и раскрытии на другом.

Таким образом, согласно предлагаемой модели образование фермент-субстратного комплекса фагового лизоцима с пептидогликаном бактериальной стенки протекает в два этапа (рис. 9). На первой стадии пептидная часть субстрата связывается с «верхним» доменом. При этом происходят конформационные перестройки, которые изменяют структуру щели между доменами. В результате этого на второй стадии происходит связывание углеводной части субстрата. Полисахаридная цепь размещается в щели молекулы фермента, что приводит к сближению гликозидной связи между остатками N-АМ и N-АГ, занимающих центры связывания D и E с аминокислотными остатками Glu 11 и Asp 20, входящими в предполагаемый каталитический центр. В отличие от куриного лизоцима в лизоциме фага Т4 эффективное связывание сахарных остатков А, В и С обеспечивается только после сближения доменов в области их расположения.

Предложенная модель объясняет различия в специфичности действия лизоцимов фага Т4 и курицы и определяет назначение «лишней» части молекулы фагового лизоцима. Лизоцимы Т-четных фагов являются примерами ферментов, необходимым условием работы которых является наличие больших и функционально оправданных изменений пространственной структуры.

В заключение хочется отметить дополнительный результат данной работы. В настоящее время пространственная организация пептидогликана клеточной стенки бактерий неизвестна, хотя и предложено несколько соответствующих моделей [34—39]. Обнаруженная высокая степень комплементарности пептидной части фрагмента пептидогликана и молекулы фагового лизоцима позволяет предположить, что конформация ДСТП в комплексе с ферментом соответствует его конформации в составе нерастворимого пептидогликана.

Мы благодарим Э. А. Бурштейна и Н. С. Веденкину за помощь в проведении флуоресцентных измерений и полезное обсуждение результатов. Мы также выражаем благодарность А. И. Денесюку, В. П. Маркину и Н. А. Лежневой за участие в работе по построению моделей, определению координат атомов ингибитора и построение проекций с помощью ЭВМ. Мы признательны проф. Б. Мэттьюзу за предоставление препринта статьи по координатам атомов лизоцима фага Т4 и пептидных углов внутреннего вращения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Matthews B. W., Remington S. J. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 71, 4178—4182.
2. Remington S. J., Ten Eyck L. F., Matthews B. W. (1977) Biochem. and Biophys. Res. Commun. 75, 265—270.
3. Remington S. J., Anderson W. F., Owen J., Ten Eyck L. F., Grainger C. T., Matthews B. W. (1978) J. Mol. Biol. 118, 81—98.
4. Blake C. C. F., Mair C. A., North A. C. T., Phillips D. C., Sarma V. R. (1967) Proc. Roy. Soc. Ser. B 167, 365—377.
5. Phillips D. C. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 57, 484—495.
6. Imoto T., Johnson L. N., North A. C. T., Phillips D. C., Rupley J. A. (1972) in the Enzymes, Third Edn. (Boyer P. D., ed.), v. 7, p. 663—868, Acad. Press, N. Y.—London.
7. Rossmann M. G., Argos P. (1976) J. Mol. Biol. 105, 75—95.
8. Remington S. J., Matthews B. W. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 75, 2180—2184.
9. Jensen H. B., Kleppe G., Schindler M., Mirelman D. (1976) Europ. J. Biochem. 66, 319—325.
10. Mirelman D., Kleppe G., Jensen H. B. (1975) Europ. J. Biochem. 55, 369—373.
11. Tsugita A., Inouye M., Terzaghi E., Streisinger G. (1968) J. Biol. Chem. 243, 391—397.
12. Троицкий А. В., Лысенко А. М. (1975) Биохимия 40, 1282—1291.
13. Braun V., Rehn K. (1969) Europ. J. Biochem. 10, 426—438.
14. Braun V., Wolff H. (1975) J. Bacteriology 123, 888—897.
15. Primosigh J., Pelzer H., Maas D., Weidel W. (1961) Biochim. et biophys. acta 46, 68—80.

16. Jollès P. (1962) in *Methods in Enzymology* (Colowick S. P. and Kaplan N., eds), v. 5, p. 137, Acad. Press, N. Y.—London.
17. Herskovits T. T., Laskowski M. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 2481—2492.
18. Chipman D. M., Grizaro V., Sharon N. (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 4388—4394.
19. Kuramitsu S., Ikeda K., Hamaguchi K., Miwa S., Nishine T. (1972) *J. Biochem.* 72, 1109—1115.
20. Cassim J. Y., Yang J. T. (1969) *Biochemistry* 8, 1947—1951.
21. Chen Y., Yang J. T., Martinez H. (1972) *Biochemistry* 11, 4120—4131.
22. Березин И. В., Клесов А. А., Рабинович М. Л. (1976) *Биоорганическая химия* 2, 680—688.
23. Manrel P., Dousou P. (1976) *J. Mol. Biol.* 102, 253—264.
24. Ananthanarayanan V. S., Bigelow C. C. (1969) *Biochemistry* 8, 3717—3723.
25. Ananthanarayanan V. S., Bigelow C. C. (1969) *Biochemistry* 8, 3723—3728.
26. Elödi P., Lakatos S. (1973) *Europ. J. Biochem.* 36, 45—52.
27. Yanari S., Bovey F. A. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 2818—2826.
28. Donovan J. W. (1969) in *Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry*, part A (Leach S. Y., ed.), p. 101, Acad Press, N. Y.
29. Cowgill R. W. (1967) *Biochim. et biophys. acta* 133, 6—18.
30. Бурштейн Э. А. (1973) в сб. *Молекулярная биология*, т. 3, с. 127—215, ВИНТИ, М.
31. Троицкий А. В., Лысенко А. М. (1975) *Биоорганическая химия* 1, 742—748.
32. Elwell M. L., Schellman J. A. (1975) *Biochim. et biophys. acta* 386, 309—323.
33. Троицкий А. В. (1978) *Изучение структурных аспектов функционирования лизоцима бактериофага Т4*, автореф. дис., М.
34. Keleman M. V., Rogers H. J. (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 68, 992—996.
35. Braun V., Gnirke H., Henning U., Rehn K. (1973) *J. Bacteriology* 114, 1264—1270.
36. Oldmixon E. H., Glauser S., Higgins M. L. (1974) *Biopolymers* 13, 2037—2060.
37. Formanek H., Formanek S., Wawra H. (1974) *Europ. J. Biochem.* 46, 279—294.
38. Formanek H., Schleifer K. H., Seidl H. P., Lindemann R., Zundel G. (1976) *FEBS Letters* 70, 150—154.
39. Burge R. E., Adams R., Balyuzi H. H. M., Reaveley D. A. (1977) *J. Mol. Biol.* 117, 955—974.

Поступила в редакцию
6.III.1979

STUDY OF CONFORMATIONAL REARRANGEMENTS OF BACTERIOPHAGE T4 LYSOZYME DURING ITS BINDING TO THE INHIBITOR

A. V. TROITSKY, Yu. N. CHIRGADZE and E. V. BRAZHNIKOV

Institute of Protein Research, USSR Academy of Sciences, Pushchino

The structural changes of bacteriophage T4 lysozyme during its binding to the inhibitor, i. e. disaccharide-tetrapeptide N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuraminyl - L - alanyl- γ -D-glutaminy - mesodiaminopimelyl-D-alanine) isolated from *Escherichia coli* cell wall have been studied. During the inhibitor binding to the protein the degree of helicity decreases by $\sim 14\%$ as was shown using the circular dichroism technique. The changes in optical properties of tryptophane, tyrosine and phenylalanine residues detected by UV difference and fluorescence spectroscopy have been observed. Based on the experimental data and a comparison of spatial organization of phage T4 lysozyme and chicken egg-white lysozyme made it possible to develop a structural model of phage T4 lysozyme functioning. This model may account for the differences in specificity of action of bacteriophage T4 and chicken egg-white lysozymes and allows to establish the role of the «extra» part of phage lysozyme. According to the model, at the first stage of binding the peptide part of the substrate comes in contact with the «upper» (with respect to the cleft) part of the protein molecule (residues 106—116 and 135—140). This results in rearrangement of the molecule, with opening of the cleft at the second stage. This makes possible the access of the polysaccharide part of the substrate to the active site and a subsequent hydrolysis of the β (1 \rightarrow 4) glycoside bond.