



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 1 * № 6 * 1975

УДК 547.96 : 576.858.9 : 543.4

КРУГОВОЙ ДИХРОИЗМ И ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ЛИЗОЦИМА БАКТЕРИОФАГА Т2

Троицкий А. В., Лысенко А. М.

Межфакультетская лаборатория биоорганической химии
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

При помощи метода КД найдено, что молекула лизоцима фага Т2 содержит 46—52% α -спиралей, 18—24% β -структур и 30% участков с неупорядоченной конформацией. Близкие значения получены и при расчетах конформации лизоцима по правилам предсказания вторичной структуры белка на основании его аминокислотной последовательности. Характер спектров флуоресценции и КД в ближней ультрафиолетовой области свидетельствует о различиях в микроокружении остатков ароматических аминокислот у лизоцимов фага Т2 и позвоночных животных.

Аминокислотные последовательности лизоцимов Т-четных фагов, с одной стороны, и лизоцимов птиц и млекопитающих — с другой, не имеют гомологичных участков [1—3], однако эти ферменты имеют сходную субстратную специфичность и являются N-ацетилмурамидгликаногидролазами (КФ 3.2.1.17) [4]. В настоящей работе методами КД и флуоресценции получены данные, указывающие на различия в конформации мурамидаз фага Т2 и позвоночных животных.

Было показано, что спектр КД лизоцима фага Т2 в далекой УФ-области имеет отрицательный максимум при 220—221 нм и плечо при 208 нм (рис. 1) в отличие от спектров других лизоцимов и α -лактальбуминов, имеющих при 208 нм максимум, а при 220—225 нм плечо или максимум меньшей интенсивности [5]. Анализ вторичной структуры лизоцима фага Т2 по спектрам КД в области поглощения пептидной связи проведен по методу Гринфельд и Фасмана [6], по изодихроичному методу Розенкранца и Шолтана [7] и по методу Чена и Янга [8]. Полученные значения

долей α -спиральной, β -конформаций и неупорядоченной (остаточной) конформаций приведены в таблице. Для сравнения указаны также соответствующие значения для лизоцима белка куриного яйца, полученные с помощью рентгеноструктурного анализа [9], а также определенные из спектров КД [6, 8].

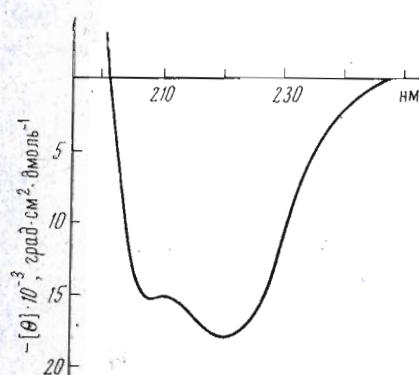


Рис. 1. Спектр КД лизоцима бактериофага Т2 в далекой УФ-области

Содержание α -спиралей, β - и неупорядоченной структур (в %) в лизоцимах бактериофага T2 и курицы

Структура	Лизоцим бактериофага T2					Лизоцим курицы		
	по спектру КД			по правилам предсказания вторичной структуры		рентгеноструктурный анализ	по спектру КД	
	[6] *	[7]	[8]	[12]	[13]		[9]	[6]
α -Спираль	52	46	52	43	58	28—42 **	29	24
β -Структура	18	24	—	34	15	10—17	10—11	—
Клубок	30	30	—	23	27	48—62	60—61	—

* Ссылки на метод или источник данных.

** Меньшее значение — истинная α -спираль, большее значение — с учетом других форм спирали.

При определении вторичной структуры белков по данным КД возможны ошибки, вызванные вкладом непептидных хромофоров в области поглощения пептидной связи, влиянием длины спиральных участков на силу вращения, трудностью адекватного сравнения различных полипептидов в связи с наличием более чем трех структурных компонентов [8, 10, 11]. Тем не менее для белков с относительно высоким содержанием α -спиралей оценка вторичной структуры по указанным выше методам хорошо согласуется со значениями, полученными при рентгеноструктурном анализе [6—8].

Расчеты вторичной структуры молекулы фагового лизоцима, выполненные путем анализа аминокислотной последовательности на основании тенденции аминокислотных остатков находиться в участках с разной конформацией, также приводят к близким, в первом приближении, значениям содержания α -спиралей, β - и клубкообразной структур. Результаты этих расчетов, проведенных по правилам, предложенным Шоу и Фасманом [12] и Г. В. Троицким и В. П. Завьяловым [13], представлены в таблице и на рис. 2. Примененные методы расчета приводят к несколько различающимся между собой результатам и не позволяют однозначно приписать ту или иную конформацию некоторым участкам (в районе аминокислотных остатков 1—27). Тем не менее видно, что распределение α -спиралей, β - и неупорядоченной

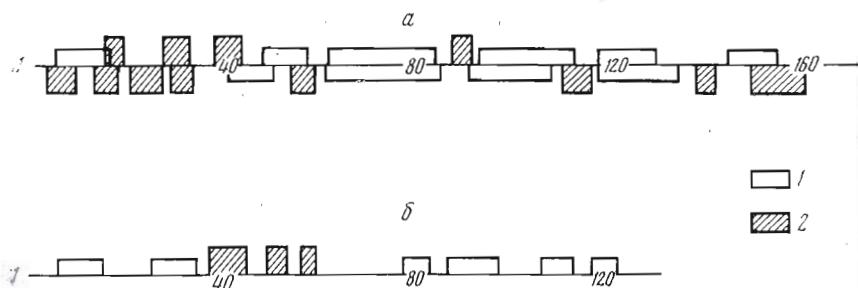


Рис. 2. Распределение α -спиралей, β - и неупорядоченной структур вдоль полипептидной цепи лизоцимов бактериофага T2 (а) и курицы (б): а — вверху расчет по методу Троицкого и Завьялова [13], внизу — по методу Шоу и Фасмана [12]; б — данные рентгеноструктурного анализа [9]; 1 — спиральные участки, 2 — участки с β -структурой

рядоченной структур вдоль полипептидной цепи лизоцима фага T2 отличается от их распределения в молекуле лизоцима курицы.

Анализ спектров КД белков в области 250—300 нм позволяет получить информацию о характере окружения и локальной конформации участков, содержащих остатки ароматических аминокислот и цистина. Однако интерпретация спектров КД в этой области сложна в связи с перекрыванием

Рис. 3. Спектр КД лизоцима бактериофага T2 в ближней УФ-области

Рис. 4. Спектры КД лизоцимов и α -лактальбуминов в ближней УФ-области. Лизоцимы: 1 — курицы [24], 2 — утки [5], 3 — человека [24], 4 — гуся [5], 5 — α -лактальбумин человека [5] и 6 — быка [25]

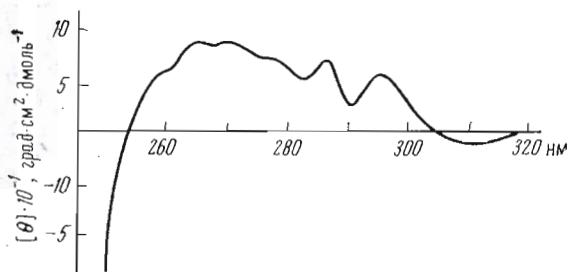


Рис. 3

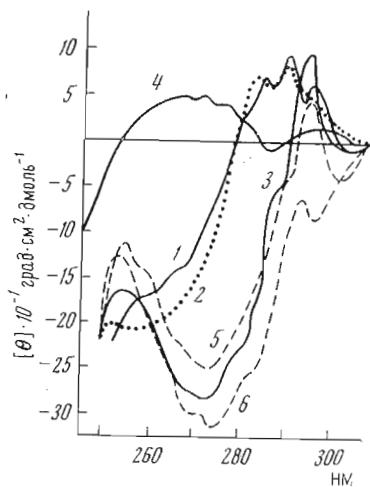


Рис. 4

полос, принадлежащих различным типам хромофоров, наличием электронных переходов между разными колебательными уровнями и возможностью гашения противоположных по знаку Коттон-эффектов, связанных с хромофорами, находящимися в разных конформациях.

Спектр КД лизоцима фага T2 в области 250—320 нм (рис. 3) имеет слабый отрицательный максимум при 309—310 нм, два хорошо разрешенных положительных максимума при 294—295 и 286 нм, минимумы при 282 и 290,5 нм и слаборазрешаемую, но отчетливую структуру в области 250—280 нм: два максимума при 270 и 280 нм, два плеча при 258—259 и 277—278 нм и минимум при 267 нм. Эллиптичность равна нулю при 254 и 304 нм. Результаты, полученные Стрикландом и соавт. [14—16] при исследовании модельных соединений и некоторых белков, позволяют с определенностью приписать полосы при 310 и 294—295 нм триптофановым остаткам. Коттон-эффекты при 286 нм находятся в той области, в которой могут вносить вклады и тирозиновые и триптофановые остатки; однако форма этой полосы [15, 16] в спектре КД лизоцима фага T2 позволяет заключить, что и она, по всей вероятности, обязана своим происхождением остаткам триптофана. Поскольку два остатка цистеина фагового лизоцима находятся в восстановленной форме [3], в спектре КД этого белка отсутствует вклад, вносимый дисульфидными связями, которые могут иметь, хотя и не всегда [17], значительную оптическую активность при 250—280 нм [16, 18, 19]. Сила вращения остатков фенилаланина в нативных белках мала [18], поэтому на основании работ Стрикланда и соавт. [20, 21] можно заключить, что широкая полоса в области 255—280 нм обусловлена в основном остатками тирозина.

КД лизоцимов птиц и млекопитающих, а также дивергировавших от них α -лактальбуминов был изучен в ряде работ [5, 22—24]. По характеру спектров в ближней УФ-области (рис. 4) лизоцим человека сходен с α -лактальбуминами и отличается от лизоцимов курицы и утки. Лизоцим гуся занимает обособленное положение. Спектр КД лизоцима фага T2 по ряду черт отличается от спектров всех остальных изученных α -лактальбуминов и лизоцимов позвоночных животных. Поскольку величина вращения на мономерное звено зависит от содержания хромофоров в молекуле белка, возникает вопрос: не являются ли наблюдаемые различия в спектрах КД следствиями только различий в аминокислотном составе рассматриваемых белков? Очевидно, это не так, поскольку наличие двух лишних остатков тирозина в лизоциме утки по сравнению с лизоцимом курицы почти не сказывается на спектре КД в области 250—280 нм. α -Лактальбумин

морской свинки имеет на один остаток триптофана меньше и на один остаток тирозина больше, чем α -лактальбумин быка, но имеет почти идентичный с ним спектр КД (на рис. 4 не показан). Хотя фаговый лизоцим и содержит всего лишь 3 остатка триптофана на молекулу белка, величина его эллиптичности при 295 нм относительно высока. Поскольку ограничение свободной подвижности боковых цепей остатков ароматических аминокислот в составе белковой глобулы является существеннейшим фактором, увеличивающим силу вращения [14, 25], можно предположить, что по крайней мере часть остатков триптофана фагового лизоцима более жестко фиксирована в трехмерной структуре молекулы белка по сравнению с остатками триптофана других лизоцимов и α -лактальбуминов. Наибольшую свободу вращения по данным КД имеют триптофановые остатки гусиного лизоцима; они имеют подвижность, приближающуюся к их подвижности у денатурированного белка [5]. Весьма существенным при рассмотрении оптической активности является учет различий в количестве дисульфидных связей в молекуле лизоцимов фага T2 и гуся по сравнению с другими лизоцимами и α -лактальбуминами. Сравнение спектров КД α -лактальбумина быка с окисленными и восстановленными SH-группами [26], позволяющее оценить вклад дисульфидных связей [27], показывает, что особенности спектров КД лизоцимов гуся и фага T2 не могут, очевидно, быть объяснены только различиями в числе дисульфидных связей, а обусловлены также свойствами окружения тирозиновых и триптофановых остатков.

Дополнительным фактором, осложняющим интерпретацию спектров КД, является изменение силы вращения электронных переходов при взаимодействии сближенных хромофоров [16]. Расчеты Коубурина и соавт. [5] показали, что отличие в спектрах КД при 280—300 нм лизоцимов курицы и утки от других представителей рассматриваемой группы белков может быть связано с присутствием димера триптофановых остатков в молекулах этих двух лизоцимов. Возможно, большая величина положительной эллиптичности у фагового лизоцима при 260—280 нм по сравнению с гусиным связана с наличием в молекуле лизоцима фага T2 димера остатков тирозина в положениях 24—25.

Таким образом, характер спектров КД рассматриваемых белков в ближней УФ-области свидетельствует в пользу предположения о различной конформации вблизи остатков ароматических аминокислот триптофана и тирозина у лизоцима бактериофага T2 по сравнению с другими изученными α -лактальбуминами и лизоцимами позвоночных животных. Обращает на себя внимание некоторое сходство спектра КД лизоцима фага T2 и гуся в области 250—275 нм. Однако при анализе подобных ситуаций следует иметь в виду, что если различия в оптической активности двух белков в ближней УФ-области указывают на различия в окружении остатков ароматических аминокислот, то сходство в спектрах КД еще не дает основания утверждать о сходстве локальных конформаций. Лизоцим гуся по аминокислотному составу, молекулярному весу и N-концевому фрагменту аминокислотной последовательности существенно отличается от всех других лизоцимов животных и α -лактальбуминов [28]. Показано, что этот фермент кодируется геном, не аллельным гену куриного лизоцима; в белке яиц черного лебедя имеются два лизоцима — «куриного» и «гусиного» типов [28]. Эволюционные взаимоотношения мурамидаз двух типов остаются пока неясными.

Спектр флуоресценции лизоцима бактериофага T2 имеет при комнатной температуре максимум при 328 нм. Положение максимума флуоресценции не меняется при возбуждении светом с длиной волны 275—295 нм; это свидетельствует о том, что спектр флуоресценции фагового лизоцима обусловлен в основном остатками триптофана. Положение максимума флуоресценции при такой короткой длине волны необычно для большинства белков и указывает на то, что остатки триптофана лизоцима фага T2 находятся в сильно неполярном окружении [29].

При добавлении к раствору фагового лизоцима при рН 3,3—8,35 и ионной силе 0,07 N-ацетилглюкозамина или его димера N,N'-диацетилхитобиозы до 500-кратного (относительно фермента) молярного избытка не происходит характерного для куриного лизоцима [34] смещения максимума флуоресценции в коротковолновую область и увеличения интенсивности флуоресценции. Это свидетельствует о том, что остатки триптофана лизоцима фага T2, в отличие от лизоцима курицы, не принимают участия в связывании молекул N-ацетилглюкозамина и его димера и микроокружение их при этом не становится менее полярным. Иные и соавт. [31] показали, что при замене остатков триптофана в положениях 126 и 158 лизоцима фага T4 остатками серина, глутамина или тирозина активность фермента сохраняется, но остаток триптофана в положении 138 может быть заменен только остатком тирозина, активность лизоцима при этом снижается в 2 раза.

На основании приведенных в настоящей работе данных можно предположить, что остатки триптофана фагового лизоцима участвуют в формировании гидрофобного ядра молекулы и их основная роль состоит в поддержании нативной структуры фермента. Полученные результаты также свидетельствуют о том, что как общая конформация белковой молекулы, так и локальная конформация вблизи остатков ароматических аминокислот различна у лизоцимов фага T2 и позвоночных животных.

Экспериментальная часть

Лизоцим бактериофага T2 выделяли по модифицированному нами методу Цугиты и соавт. [4]. Очистка фермента включала следующие стадии: осаждение риванолом фрагментов бактерий, фаговых частиц, ДНК и кислых белков, концентрирование лизоцима на колонке с амберлитом IRC-50 (20—50 меш) и последовательную хроматографию на амберлитре IRC-50 (50—100 меш), СМ-сепадекс G-50 и амберлитре IRC-50 (100—200 меш). Очищенный фермент давал одну полосу при электрофорезе в полиакриламидном геле в системе с додецилсульфатом натрия и две близко идущие полосы (активные формы I и II) в β-аланиновой системе при рН 4,5. Аминокислотный состав полученного фермента совпадал с рассчитанным по первичной структуре [32].

N-ацетилглюкозамин, полученный путем полного кислотного гидролиза хитина, любезно предоставлен И. А. Черкасовым (Институт органической химии АН СССР). Для получения N,N'-диацетилхитобиозы панцири речных раков промывали горячей водой, измельчали в шаровой мельнице, обрабатывали 1 н. HCl, 1 н. NaOH, водой, ацетоном и высушивали. Частичный кислотный гидролиз хитина 11 н. HCl и разделение олигосахаридов на угольно-целитовой колонке проводили по методу Рацли [33]. Дальнейшую очистку проводили с помощью препаративной восходящей хроматографии на бумаге ватман ЗМ в системе пиридин — этилацетат — вода (1 : 2 : 2). N,N'-диацетилхитобиозу элюировали водой, элюят упаривали в роторном испарителе и затем сушили над KOH. Чистоту N-ацетилглюкозамина и его димера проверяли с помощью БХ в нескольких системах растворителей. Аминосахара идентифицировали по методу Шарона и Сейфтера [34].

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически (спектрофотометр СФ-16, СССР, и «Hitachi» 124, Япония), принимая для лизоцима фага T2 $E_{280,1\text{ см}}^{\%} = 12,8$ [4].

Спектры КД снимали в дихромографе «Roussel-Jouan» II (Франция) при комнатной температуре в кювете длиной 1 см (250—320 нм) и 0,1 см (200—250 нм). При измерениях в далекой УФ-области оптический путь прибора предусматривали азотом. Концентрация фагового лизоцима составляла 0,014 и 0,028% при измерениях в области 200—250 нм и 0,126% при измерениях в области 250—320 нм. Растворы белка дialisовали против 0,05 M Na,

К-фосфатного буфера (рН 7) в течение ночи при 3° и перед работой фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры. Для получения базовой линии использовали тот же буфер.

Спектры флуоресценции снимали в спектрофлуориметре MPF-2A (Япония), калибровка длин волн которого была проверена по ксеноновой лампе и по раствору хроматографически чистого *L*-триптофана («Reanal», Венгрия). Фаговый лизоцим диализовали против 0,07 М KCl (осч.) в течение ночи при 3° и фильтровали через нитроцеллюлозный фильтр. Для снятия спектров в диапазоне рН 3,3—8,35 раствор лизоцима фага T2 смешивали в кювете прибора с соответствующим буферным раствором, имеющим *I* 0,07. Использовали следующие буферные смеси: глицин — HCl, CH₃COONa — HCl, KH₂PO₄ — K₂HPO₄, трис-HCl. Конечная концентрация фагового лизоцима составляла 0,004%. Растворы N-ацетилглюкозамина или N,N'-диацетилхитобиозы в 0,07 М KCl добавляли микропипеткой непосредственно в кювету спектрофлуориметра.

Авторы благодарны А. А. Белоусовой за помощь при получении фаголизатов, Г. А. Когану и Н. А. Кравченко за обсуждение результатов работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jollès J., Leemputten E. V., Mouton A., Jollès P. (1971) Biochim. et biophys. acta, 257, 497—510.
2. Canfield R. E., Kammerman S., Sobel J. H., Morgan E. J. (1971) Nature New Biol., 232, 16—17.
3. Tsugita A., Inouye M. (1968) J. Mol. Biol., 37, 201—212.
4. Tsugita A., Inouye M., Terzaghi E., Streisinger G. (1968) J. Biol. Chem., 243, 391—397.
5. Cowburn D. A., Brew K., Gratzer W. B. (1972) Biochemistry, 11, 1228—1234.
6. Greenfield N., Fasman D. G. (1969) Biochemistry, 8, 4108—4115.
7. Rosenkranz H., Scholtan W. (1971) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 352, 896—904.
8. Chen Y.-H., Yang J. T., Martinez H. M. (1972) Biochemistry, 11, 4120—4131.
9. Blake C. C. F., Mair G. A., North A. C. T., Phillips D. C., Sarma V. R. (1967) Proc. Roy. Soc., 167B, 365—388.
10. Усманов Р. А., Кочетов Г. А. (1973) Успехи соврем. биол., 75, 6—25.
11. Goodman M., Toniolo C. (1968) Biopolymers, 6, 1673—1689.
12. Chou P. I., Fasman G. D. (1974) Biochemistry, 13, 222—244.
13. Троицкий Г. В., Завьялов В. М. (1972) Молекулярн. биология, 6, 635—647.
14. Strickland E. H., Horwitz J., Billups C. (1969) Biochemistry, 8, 3205—3213.
15. Horwitz J., Strickland E. H., Billups C. (1970) J. Amer. Chem. Soc., 92, 2119—2129.
16. Strickland E. H., Wilchek M., Horwitz J., Billups C. (1970) J. Biol. Chem., 245, 4168—4177.
17. Fretto L., Strickland E. H. (1973) Biochim. et biophys. acta, 328, 396—406.
18. Beychok S. (1967) in Poly- α -amino Acids (Fasman G. D., ed.), p. 293—337.
19. Breslow E. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 67, 493—500.
20. Strickland E. H., Kay E., Shannon L. M. (1970) J. Biol. Chem., 245, 1233—1238.
21. Horwitz J., Strickland E. H. Billups C. (1969) J. Amer. Chem. Soc., 91, 184—190.
22. Holladay L. A., Sophianopoulos A. J. (1972) J. Biol. Chem., 247, 1976—1979.
23. Ikeda K., Hamaguchi K., Miwa S., Nishina T. (1972) J. Biochem., 71, 371—378.
24. Halper J. P., Latovitzki N., Bernstein H., Beychok S. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 68, 517—522.
25. Edelkoch H., Lippoldt R. E., Wilchek M. (1968) J. Biol. Chem., 243, 4799—4805.
26. Tamburro A. M., Jori G., Vidali G., Scatturin A., Saccomani G. (1972) Biochim. et biophys. acta, 263, 704—713.
27. Takagi T., Izutsu T. (1974) J. Biochem. 75, 441—446.
28. Arnheim N., Hindenburg A., Begg G. S., Morgan F. J. (1973) J. Biol. Chem., 248, 8036—8042.
29. Бурштейн Э. А. (1973) в сб.: Молекулярная биология, т. 3 (под ред. Волькенштейна М. В.), срп. 127—245, ВИНТИ, М.
30. Sharon N. (1967) Proc. Roy. Soc., 167B, 402—415.
31. Inouye M., Akaboshi E., Kuroda M., Tsugita A. (1970) J. Mol. Biol., 50, 71—81.
32. Inouye M., Tsugita A. (1968) J. Mol. Biol., 37, 213—223.
33. Rupley J. A. (1964) Biochim. et biophys. acta, 83, 245—255.
34. Sharon N., Seifter S. (1964) J. Biol. Chem., 239, PC2398—PC2399.

Поступила в редакцию
5.XI.1974

CIRCULAR DICHROISM AND FLUORESCENCE
OF BACTERIOPHAGE T2 LYSOZYME

TROITSKY A. V., LISENKO A. M.

*Laboratory of Bioorganic Chemistry,
M. V. Lomonosov State University, Moscow*

The quantity of α -helical, β -structured and unordered conformation in the secondary structure of bacteriophage T2 lysozyme have been determined by CD method as being 46–52%, 18–24% and 30%, respectively. Similar values have been obtained using the rules of predicting the secondary structures of proteins by amino acid sequences. The CD spectrum of T2 phage lysozyme at 250–320 nm differs from that of vertebrates. The fluorescence spectrum of the phage lysozyme has a maximum at 328 nm. The fluorescence intensity and the position of the maximum does not change if the enzyme solution is supplemented with N-acetylglucosamine or di-N-acetylglucosamine. The results obtained indicate that both the overall conformation of a protein molecule and the local conformation in the vicinity of aromatic acid residues are different in lysozyme of bacteriophage T2 and in that of vertebrates.