



УДК 577.36.02+541.128.13

## КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ В ГЕТЕРОГЕННЫХ СИСТЕМАХ

III. ЗАВИСИМОСТЬ ГИДРОЛИЗА БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК *MICROCOCCLUS LYSODEIKTICUS* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЛИЗОЦИМА ОТ pH \*

Клесов А. А., Рабинович М. Л., Березин Н. В.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
химический факультет

Исследована pH-зависимость кинетических параметров расщепления бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus* под действием лизоцима белка куриных яиц. Найдено, что pH-профиль эффективной каталитической константы в интервале pH 4—10 имеет вид симметричной колоколообразной кривой с оптимумом при pH 7,1, в то время как величина кажущейся константы Михаэлиса не зависит от pH в указанном интервале. Значения рК ионогенных групп, контролирурующих каталитическую активность лизоцима, составляют 5,0 и 9,2. Изучение кинетики инактивации лизоцима под действием ультразвука показало, что ионогенная группа с рК 9,2 может контролировать каталитически активную конформацию активного центра лизоцима в растворе. Ионогенная группа лизоцима с рК 5,0 не влияет на конформацию активного центра фермента, хотя протонирование этой группы приводит к потере каталитической активности лизоцима. На основании полученных данных рассматриваются возможные механизмы реакции расщепления бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus*, катализируемой лизоцимом.

Изучение pH-зависимости гидролиза олигосахаридных «модельных» субстратов под действием лизоцима проводилось в ряде работ (см. [2—5]). Как правило, полученные при этом данные свидетельствуют об участии в ферментативной реакции двух ионогенных групп активного центра лизоцима с рК в области 3,0—5,0 и 6,0—6,5. Рассмотрение этих данных совместно с результатами рентгеноструктурного анализа «непродуктивного» комплекса лизоцима с олигосахаридами позволило предложить детальный механизм расщепления  $\beta$ -1,4-гликозидной связи в «модельных» субстратах под действием лизоцима. Однако в настоящее время имеются веские основания против обобщения предложенного механизма действия лизоцима на его природный субстрат, бактериальную клеточную стенку. Главным возражением против подобного обобщения является различие в профилях pH-зависимости гидролиза низкомолекулярных «модельных» субстратов, с одной стороны, и бактериальной клеточной стенки — с другой [6—9]. Однако практически во всех случаях исследования pH-зависимости кинетики ферментативного гидролиза клеточной стенки бактерий в качестве основного параметра использовалась активность лизоцима, не имеющая простого кинетического смысла.

\* Сообщение II см. [1].

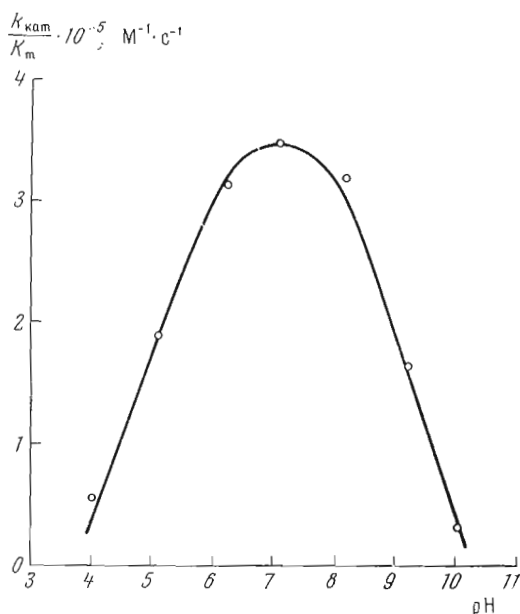


Рис. 1. Зависимость константы скорости второго порядка расщепления бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus* под действием лизоцима от рН. Кривая рассчитана теоретически с использованием выражения (4) и значений констант  $pK_a$  5,0,  $pK_b$  9,2. Концентрация лизоцима  $1 \cdot 10^{-8}$  М, начальная весовая концентрация бактериальных клеток 0,01 — 0,1 мг/мл

В предыдущих работах [10, 1] нами были изучены кинетические закономерности расщепления бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus* под действием лизоцима белка куриных яиц и сделаны предположения относительно смысла кинетических параметров (эффективная каталитическая константа ( $k_{кат}$ ) и кажущаяся константа Михаэлиса ( $K_m(каж)$ )), характеризующих процесс лизиса. Цель настоящей работы состоит в изучении влияния рН на кинетические параметры процесса лизиса и сопоставлении рН-профилей расщепления природного и низкомолекулярных «модельных» субстратов под действием лизоцима.

Для изучения рН-зависимости кинетических параметров лизиса нами были выбраны условия, в которых, как следует из работы [10], скорость бактериолитического действия лизоцима описывается выражением, подобным уравнению Михаэлиса — Ментен. Значения кинетических параметров находили с помощью обработки экспериментальных данных зави-

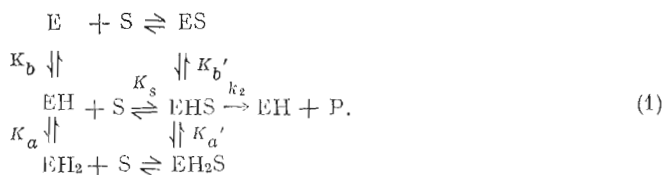
Влияние рН на кинетические параметры расщепления бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus* под действием лизоцима  $[E]_0 1 \cdot 10^{-8}$  М, начальная весовая концентрация бактериальных клеток 0,01—0,1 мг/мл

рН	$k_{кат} \cdot 10^5, c^{-1} *$	$K_m(каж) \cdot 10^5, мг/мл$	$k_{кат}/K_m(каж) \cdot 10^5, M^{-1} \cdot c^{-1}$
4,0	$0,3 \pm 0,04$	$2,8 \pm 0,2$	0,66
5,1	$1,0 \pm 0,05$	$2,8 \pm 0,1$	2,16
6,3	$1,6 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,4$	3,18
7,1	$1,9 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,3$	3,66
8,2	$1,7 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,3$	3,54
9,2	$0,9 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,3$	2,16
10,0	$0,15 \pm 0,02$	$2,5 \pm 0,3$	0,36

\* Значения каталитической константы получены при использовании данных работы [1].

симости начальной скорости лизиса ( $v'$ ) от весовой концентрации суспензии бактериальных клеток  $[Q]$  в координатах  $(1/v'; 1/[Q])$ , аналогичных координатам Лайнуивера — Берка. Результаты исследования кинетики бактериолитического действия лизоцима при различных значениях рН в интервале 4—10 приведены в таблице. Из данных таблицы видно, что во всем исследованном интервале рН значение кажущейся константы Михаэлиса ( $K_{m(\text{каж})}$ ) постоянно в пределах ошибки эксперимента и равно  $(2,8 \pm 0,4) \cdot 10^{-2}$  мг/мл. рН-Зависимость эффективной каталитической константы,  $k_{\text{кат}}$ , и константы скорости второго порядка ферментативного расщепления клеток,  $k_{\text{кат}}/K_{m(\text{каж})}$ , имеет колоколообразную форму с максимумом при рН 7,1 (рис. 1).

Полученные результаты согласуются, в частности, со схемой (1) двухстадийной ферментативной реакции, контролируемой двумя ионогенными группами активного центра фермента с константами диссоциации  $K_a$  и  $K_b$  (в свободном ферменте),  $K'_a$  и  $K'_b$  (в фермент-субстратном комплексе)



Выражения для каталитической константы, кажущейся константы Михаэлиса и константы скорости второго порядка ферментативной реакции (1) можно записать в следующем виде [11]:

$$k_{\text{кат}} = \frac{k_2}{1 + \frac{[H^+]}{K'_a} + \frac{K'_b}{[H^+]}} \quad (2)$$

$$K_{m(\text{каж})} = K_s \frac{1 + \frac{[H^+]}{K_a} + \frac{K_b}{[H^+]}}{1 + \frac{[H^+]}{K'_a} + \frac{K'_b}{[H^+]}} \quad (3)$$

$$\frac{k_{\text{кат}}}{K_{m(\text{каж})}} = \frac{k_2}{K_s} \cdot \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_a} + \frac{K_b}{[H^+]}} \quad (4)$$

Так как в нашем случае величина кажущейся константы Михаэлиса ферментативной реакции практически не зависит от рН (таблица), профили рН-зависимости констант  $k_{\text{кат}}$  и  $k_{\text{кат}}/K_{m(\text{каж})}$  идентичны и значения констант диссоциации ионогенных групп свободного фермента и фермент-субстратного комплекса соответственно равны друг другу ( $K_a = K'_a$ ;  $K_b = K'_b$ ). Значения константы  $pK_a$  и константы  $pK_b$ , рассчитанные из данных рис. 1 с использованием выражения (4), оказались равны 5,0 и 9,2 соответственно.

Данные таблицы могут быть также описаны схемой ферментативной реакции, в которой ионогенные группы с  $pK$  5,0 и (или) 9,2 принадлежат субстрату, а не ферменту (см. [11]). Однако такая возможность маловероятна, поскольку значения  $pK$  основных ионогенных групп пептидогликана клеточной стенки (высокомолекулярного субстрата лизоцима) составляют

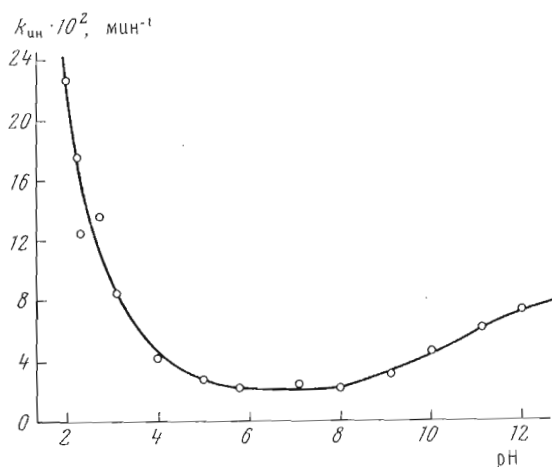


Рис. 2. Зависимость константы скорости инактивации лизоцима под действием ультразвука от рН. Концентрация лизоцима  $8,7 \cdot 10^{-7} \text{ M}$

3,5 для карбоксильных групп N-ацетилмурамовой кислоты и концевого остатка аланина пентапептидного фрагмента пептидогликана и 10,5 для  $\epsilon$ -аминогруппы остатка лизина [12] и существенно отличаются от найденных нами значений рК. Итак, можно полагать, что фермент в свободном состоянии имеет две ионогенные группы с рК 5,0 и 9,2, контролирующие его каталитическую активность по отношению к бактериальным клеткам, причем группа с рК 5,0 функционирует в депротонированной форме, а группа с рК 9,2 — в протонированной.

Для установления роли ионогенной группы с рК 9,2 в ферментативном расщеплении бактериальных клеток нами было предпринято изучение конформационного состояния активного центра лизоцима в зависимости от рН при помощи нового ультразвукового метода [13, 14], суть которого состоит в следующем. Под действием кавитационного ультразвука в водном растворе образуются свободные радикалы (главным образом гидроксильные и гидропероксильные), при попадании которых в активный центр фермента обычно происходит его инактивация вследствие деструкции какой-либо функциональной группы активного центра (как правило, остатка триптофана [13]). Таким образом, скорость инактивации фермента под действием ультразвука зависит от доступности данной лабильной группы для свободных радикалов из среды. В свою очередь доступность лабильной группы может меняться при конформационных переходах активного центра фермента, вызываемых внешними факторами (рН, температура, добавленные эффекторы и т. д.). Итак, изучая зависимость скорости инактивации фермента под действием ультразвука при изменении внешних факторов, можно делать вывод о характере конформационных переходов активного центра.

В настоящей работе было найдено, что при действии кавитационного ультразвука действительно происходит необратимая инактивация лизоцима, вызванная, видимо, разрушением какой-либо важной для каталитической активности функциональной группы активного центра фермента. В роли такой лабильной группы могут выступать, например, остатки триптофана 62, 63 или 108 активного центра лизоцима, модификация которых приводит к потере ферментативной активности [15—19]. Зависимость ферментативной активности лизоцима от времени озвучивания раствора фермента следует кинетике первого порядка, причем величина константы скорости инактивации ( $k_{ин}$ ) не зависит от начальной концентрации лизоцима.

В диапазоне рН 5—8 величина  $k_{\text{ли}}$  практически постоянна и равна  $(2,4 \pm 0,3) \cdot 10^{-2}$  мин<sup>-1</sup> (рис. 2). При более высоких и более низких значениях рН величина константы скорости ультразвуковой инактивации лизоцима существенно возрастает. Полученные результаты можно описать схемой, согласно которой в растворе существует три равновесные конформационные формы лизоцима — «кислотная», «нейтральная» и «щелочная», причем первая и третья формы фермента инактивируются в поле ультразвука быстрее, чем вторая. Переход «нейтральной» формы лизоцима в «щелочную» приводит к меньшему возрастанию скорости инактивации фермента по сравнению с теорией и, видимо, сопровождается вторичными структурными перестройками в активном центре. Из рис. 2 следует, что переход «нейтральной» формы лизоцима в «кислотную» контролируется ионогенной группой из  $pK < 2,0$ , а переход из «нейтральной» в «щелочную» — ионогенной группой с  $pK$  в области 9—11. Подобные конформационные переходы лизоцима обнаружены также в ряде других работ при использовании других методов исследования. Так, в работе [20] было показано, что обратимый конформационный переход лизоцима в щелочной области рН контролируется ионогенной группой с  $pK$  9,9. Данные по исследованию ультразвуковой инактивации лизоцима согласуются также с работой [21], в которой было найдено, что при низких значениях рН лизоцим претерпевает обратимую денатурацию, которая зависит от ионизации карбоксильных групп свободного фермента с  $pK$  в области 1,4—1,8. Можно полагать, что ионогенная группа лизоцима с  $pK$  9,2 (по данным рН-зависимости кинетики ферментативного расщепления бактериальных клеток) контролирует конформацию активного центра фермента таким образом, что при ее депротонировании происходит конформационное изменение лизоцима, сопровождающееся «раскрыванием» щели активного центра фермента. Подобный конформационный переход, также сопровождающийся дезориентацией активного центра лизоцима, по всей вероятности, происходит при протонировании ионогенной группы лизоцима с  $pK < 2,0$ . Такие рН-зависимые конформационные переходы протекают обычно вследствие разрушения «солевого мостика», поддерживающего активную конформацию каталитического центра фермента, как было показано для  $\alpha$ -химотрипсина и различных форм трипсина [13]. Можно полагать, что каталитически активная конформация активного центра лизоцима также поддерживается «солевым мостиком», образованным за счет электростатического взаимодействия между отрицательно заряженной карбоксильной группой с  $pK < 2,0$  и положительно заряженной  $\alpha$ -амино- или  $\epsilon$ -аминогруппой фермента с  $pK$  9,2. По-видимому, карбоксильная группа с  $pK < 2,0$  принадлежит остатку Asp-66 лизоцима, имеющему аномально низкое значение  $pK$  (1,9 [22]; 2,0 [23]; 1,5—2,0 [24]), а также обладающему наименьшей реакционной способностью по отношению к модификаторам [24] и экранированному от внешней среды полипептидными цепями фермента [22, 23].

Обнаруженная в настоящей работе ионогенная группа с  $pK$  5,0, контролирующая каталитическую активность лизоцима, никак не проявляется в рН-зависимости константы скорости инактивации фермента под действием ультразвука (см. рис. 2). Следовательно, протонирование этой группы не приводит к какому-либо существенному конформационному изменению в активном центре лизоцима, хотя и делает фермент каталитически неактивным.

По данным рентгеноструктурного анализа «непродуктивных» комплексов лизоцима с олигосахаридами, химической модификации и результатам кинетического изучения гидролиза олигосахаридных субстратов под действием лизоцима, основную роль в осуществлении ферментативного гидролиза «модельных» субстратов играют две карбоксильные группы активного центра лизоцима, принадлежащие боковым цепям глутаминовой кислоты 35 и аспарагиновой кислоты 52 [2—5]. Согласно предложенному

механизму, ферментативное расщепление гликозидной связи протекает по механизму общекислотного катализа в результате протонирования гликозидного атома кислорода недиссоциированной карбоксильной группой Glu-35 с  $pK$  6,0—6,5, в то время как отрицательно заряженная карбоксильная группа Asp-52 ( $pK$  3,0—5,0) функционирует в роли «электростатического катализатора», стабилизируя образующийся карбокатион (см. [2—5]). Однако  $pH$ -зависимость расщепления бактериальных клеток под действием лизоцима (см. рис. 1) указывает на участие только одной карбоксильной группы с  $pK$  5,0 в скорость-лимитирующей стадии ферментативной реакции, причем каталитически активным состоянием этой группы является ее отрицательно заряженная форма. Возможно, в случае расщепления пептидогликана бактериальной оболочки элементарный акт протонирования гликозидного кислорода кислотной группой активного центра фермента перестает быть лимитирующей стадией гидролиза в отличие от низкомолекулярных субстратов, так что эта стадия уже не проявляется в  $pH$ -зависимости константы скорости расщепления бактериальной клеточной стенки.

Остановимся теперь на возможных причинах независимости константы Михаэлиса ферментативного лизиса бактериальных клеток от  $pH$  (таблица). Как следует из обзора Строминджера [25], более 50% карбоксильных групп  $N$ -ацетилмурамовой кислоты пептидогликана клеточной стенки бактерий *Micrococcus lysodeikticus* являются незамещенными. Значения  $pK$  этих групп, определенные в работе [12], составляют примерно 3,5. Положительный же заряд на поверхности бактериальной клетки, согласно схеме строения пептидогликана [25], существенно меньше отрицательного. Таким образом, поверхность бактериальной клетки *Micrococcus lysodeikticus* имеет общий отрицательный заряд. Так как лизоцим является положительно заряженным белком, с изоэлектрической точкой около 11 [7], электростатическое взаимодействие фермента и бактериальной клеточной стенки в исследованном интервале  $pH$  4—10 должно быть практически одинаковым. Поэтому если признать, что электростатические силы вносят основной вклад в адсорбционное взаимодействие лизоцима с клеточной стенкой *Micrococcus lysodeikticus*, то независимость константы адсорбции от  $pH$  в интервале 4—10 становится вполне понятной.

### Экспериментальная часть

Лизоцим белка куриных яиц был получен из фирмы «Reanal» (Венгрия), дополнительной очистке не подвергался. Получение бактериальной культуры *Micrococcus lysodeikticus*, а также методика проведения кинетических экспериментов описаны в сообщении I [10]. При изучении кинетики бактериолитического действия лизоцима в интервале  $pH$  4—5 использовали ацетатный, при 6—7 — фосфатный и при  $pH$  8—10 — аммиачно-ацетатный буфер. Ионная сила буферных растворов во всех случаях доводилась хлористым натрием до значения 0,04. Кинетические измерения проводили при 25°.

При изучении кинетики ультразвуковой инактивации лизоцима источником ультразвука служил генератор УТС-1М (частота 880 кГц) с плавным регулированием интенсивности. Рабочая интенсивность была равна 2 Вт/см<sup>2</sup> (порог кавитации в условиях настоящей работы соответствовал примерно 1 Вт/см<sup>2</sup>). Озвучивание водных разбавленных растворов лизоцима ( $8,7 \cdot 10^{-7}$  М) проводили в термостатируемой чашке объемом 10 мл при 25°. За время озвучивания температура раствора не поднималась более чем на 1°. Контроль активности лизоцима в процессе ультразвуковой инактивации осуществляли отбором проб раствора фермента и добавлением их в чашку двухлучевого регистрирующего спектрофотометра «Hitachi» EPS-3 (Япония), содержащую суспензию бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus* в концентрации 0,1 мг/мл при  $pH$  5,0

(0,01 М ацетатный буфер + NaCl, ионная сила 0,04) и 25°. В этих условиях регистрируемая скорость ферментативного лизиса клеток (при длине волны 450 нм) прямо пропорциональна концентрации лизоцима в реакционной системе.

В настоящей работе нас интересовали лишь те рН-индуцируемые изменения скорости ультразвуковой инактивации фермента, которые отражают изменения, происходящие в его активном центре, а не общие изменения свойств среды под действием ультразвука. Поэтому нами был использован следующий методический прием. В работе [13] показано, что при воздействии кавитационного ультразвука на водный раствор красителя профлавина (3,6-диампиноакридина) происходит его обесцвечивание. Константу скорости ультразвукового обесцвечивания профлавина можно считать параметром, чувствительным к изменению свойств среды по отношению к ультразвуку. Поэтому изменение скорости ультразвуковой инактивации фермента исследовали в условиях, при которых существенно не меняется скорость обесцвечивания профлавина под действием ультразвука.

Авторы выражают благодарность канд. хим. наук А. М. Клибанову за помощь в проведении экспериментов по ультразвуковой инактивации лизоцима и интерес к работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Рабинович М. Л., Клесов А. А., Березин И. В. (1976) *Биоорганическая химия*, 2, 689—699.
2. Максимов В. И. (1973) *Успехи химии*, 42, 2073—2094.
3. Imoto T., Johnson L. N., North A. C. T., Phillips D. S., Rupley J. A. (1972) in *The Enzymes* (Boyer P. D., ed.), vol. 7, pp. 665—703, Acad. Press, New York.
4. Blake C. C. F., Mair G. A., North A. C. T., Phillips D. S., Sarma Y. R. (1967) *Proc. Roy. Soc. Ser. B*, 167, 365—377.
5. Banerjee S. K., Kregar I., Turk V., Rupley J. A. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 4786—4792.
6. Neuberger A., Wilson B. M. (1967) *Biochim. et biophys. acta*, 147, 473—486.
7. Davies R. C., Neuberger A., Wilson B. M. (1969) *Biochim. et biophys. acta*, 178, 294—305.
8. Parsons S. M., Jao L., Dahlquist F. W., Borders C. L., Jr., Groff T., Racs J., Raftery M. A. (1969) *Biochemistry*, 8, 700—712.
9. Saint-Blancard J., Jolles P. (1972) *Biochimie*, 54, 7—15.
10. Березин И. В., Клесов А. А., Рабинович М. Л. (1976) *Биоорганическая химия*, 2, 680—688.
11. Березин И. В., Клесов А. А. (1976) *Практический курс химической и ферментативной кинетики*, с. 219—221, Изд. МГУ.
12. Mirelman D., Sharon N. (1966) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 24, 237—243.
13. Клибанов А. М., Мартинек К., Березин И. В. (1974) *Биохимия*, 39, 878—887.
14. Berezin I. V., Klibanov A. M., Klyosov A. A., Martinck K., Svedas V. K. (1975) *FEBS Lett.*, 49, 325—328.
15. Borders C. J., Jr., Jorkasky D. K., Pearson S. E. (1972) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 49, 246—251.
16. Srivastava V. K., Bigelov C. C. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, 285, 373—376.
17. Yashinsky G. Y. (1972) *FEBS Lett.*, 26, 123—126.
18. Shechter Y., Burstein Y., Patchornik A. (1972) *Biochemistry*, 11, 653—660.
19. Hartdegen F. J., Rupley J. A. (1973) *J. Mol. Biol.*, 80, 649—656.
20. Aboderin A. A., Boedefeld E., Luisi P. L. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, 328, 31—34.
21. Sophianopoulos A. J., Weiss B. L. (1964) *Biochemistry*, 3, 1920—1928.
22. Banerjee S. K., Rupley J. A. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 2117—2124.
23. Timasheff S. N. (1972) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 150, 318—323.
24. Kramer K. J., Rupley J. A. (1973) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 156, 414—425.
25. Strominger J. L., Ghuyzen J.-M. (1967) *Science*, 156, 213—221.

Поступила в редакцию  
5.IX.1975

**KINETICS OF ENZYMATIC REACTIONS IN HETEROGENEOUS SYSTEMS.  
III. THE pH-DEPENDENCE OF LYSOZYME CATALYZED HYDROLYSIS  
OF BACTERIAL CELLS *MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS***

KLYOSOV A. A., RABINOWITCH M. L., BEREZIN I. V.

*Department of Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow*

The catalytic activity of hen egg white lysozyme towards *Micrococcus lysodeikticus* bacterial cells is controlled by two ionogenic groups with pK of 5.0 and 9.2 both for the free enzyme and enzyme-substrate complex. A group with pK of 5.0 supposedly belongs to the Asp-52 residue of the enzyme active centre and takes part in catalysis as the anionic form. A group with pK of 9.2 might belong to a «salt bridge» supporting catalytically active conformation of the lysozyme active centre, that has been proved by the new «ultrasound method». The ionogenic group of Glu-35, which participates in the hydrolysis of low molecular weight oligosaccharide substrates is kinetically insignificant for lysis of the bacterial cells.

---