

П. В. АФАНАСЬЕВ, Б. А. ТАЛМУД и член-корреспондент АН СССР Д. Л. ТАЛМУД

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ С ЭФИРАМИ АМИНОКИСЛОТ

В последние годы В. В. Коршак с сотр. (1) показали большую лабильность образующихся в процессе поликонденсации полимеров, отдельные звенья которых сравнительно подвижны. Обнаруженные в биохимии процессы трансамидирования и транспептидации можно в известной мере рассматривать как частные случаи установленных Коршаком превращений.

Из многочисленных работ, проведенных с применением изотопов, начатых еще Шенгеймером (2), следует динамический характер состояния белков в живом организме. Само собой разумеется, что самая возможность осуществления подобных процессов предполагает наличие богатых энергией исходных соединений, за счет которых происходят динамические процессы превращения полимеров. В биологических системах источниками энергии могут быть макроэргические соединения.

В настоящей работе была сделана попытка осуществить модель подобного рода динамических процессов между глобулярным белком и эфиром аминокислоты. В результате осуществления такой модели было обнаружено взаимодействие между глобулярным белком и производными аминокислот, состоящее в переносе аминокислотного остатка на белок и сопровождающееся выделением из белка другой аминокислоты без нарушения глобулярного состояния белка.

Опыты проводились следующим образом. К 1% раствору кристаллического яичного альбумина в фосфатном буфере (рН 7,5) прибавлялся раствор солянокислого этилового эфира гликокола, к которому предварительно был добавлен эквивалент едкого натра; смесь имела рН 8,2. Весовые количества белка и эфира гликокола относились как 1 : 2. Смесь помещалась в термостат при 37° на сутки и более, после чего подвергалась исследованию.

Прежде всего было обращено внимание на изменение рН раствора от 8,2 до 4,5. Такое падение рН может быть вызвано рядом причин: во-первых, омылением эфира гликокола с выделением свободного гликокола, во-вторых, образованием дикетопиперазина и, наконец, в-третьих, взаимодействием эфира гликокола с белком. Затем определялось число кислых и основных групп в молекуле белка до и после взаимодействия с эфиром гликокола по методу, основанному на способности кислых и основных групп давать нерастворимые соединения с некоторыми красителями в буферных растворах (3).

Оказалось, что в белке после взаимодействия его с эфиром гликокола число кислых групп значительно уменьшается. Выраженное в молях красителя сафранина О, связанных с  $1 \cdot 10^4$  г белка, число кислых групп уменьшалось с 13,4 до 4. Число основных групп в белке при этом не меняется. Как видно из рис. 1, падение числа кислых групп изменяется в зависимости от времени взаимодействия.

Исходный яичный альбумин, без эфира гликокола, в тех же условиях через 74 часа не показывает никаких отклонений числа кислых или основных групп. Яичный альбумин, предварительно денатурированный теплом, при стоянии с эфиром гликокола в термостате через сутки дает прочный студень. Сам денатурированный белок без эфира через 68 час. стояния в термостате показывает увеличение числа кислых групп с 13,4 до 16 мол. сафранина О и увеличение числа основных групп с 7 мол. красителя оранж Г до 9,8 на  $1 \cdot 10^4$  г белка.

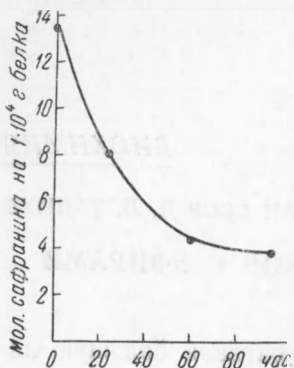


Рис. 1

В другой серии опытов, после стояния яичного альбумина с эфиром гликокола в описанных выше условиях, раствор ставился на равновесный диализ против воды. В диализате могли находиться непрореагировавший эфир гликокола, гликокол, дикетопиперазин, хлористый натрий и соли буфера. Бумажная хроматография диализата показала присутствие в нем, кроме гликокола, аспарагиновой кислоты. Дикетопиперазин при этом не проявляется. Для того, чтобы из-

быток гликокола не мешал анализу других аминокислот, диализат адсорбировался на угле и элюат исследовался с помощью бумажной хроматографии. Применялась бумажная хроматография двух видов: обычная распределительная и основанная на высаливании<sup>(4)</sup>. На рис. 2 показана хроматограмма элюата, полученная методом высаливания. Здесь 1 обозначает место нанесения аспарагиновой кислоты в качестве контроля, 2 — место нанесения элюата, а — а — граница предварительного пропитывания бумаги концентрированным фосфатным буфером.

Кроме бумажной хроматографии, была испытана также хроматографическая адсорбция на анионите ММГ-1 с последующим титрованием элюата спиртовой щелочью по Христенсену<sup>(5)</sup>. Так как бумажная хроматография указывала на отсутствие глутаминовой кислоты, мы считали, что титруется только аспарагиновая кислота. Было найдено, что в результате взаимодействия яичного альбумина с эфиром гликокола освобождается 21% аспарагиновой кислоты от общего количества аспарагиновой кислоты в исходном белке, что соответствует 7 аминокислотным остаткам на 1 моль белка.

Полностью отдиализованный раствор продукта взаимодействия белка с эфиром гликокола подвергался гидролизу соляной кислотой, после чего проводилось количественное определение гликокола в гидролизате<sup>(6)</sup>. Было найдено, что количество гликокола в гидролизате возросло с 3,13% в исходном белке до 4,26%. Это соответствует увеличению числа аминокислотных остатков гликокола в молекуле белка после опыта на 6,8 остатков. Серия опытов, поставленная с яичным альбумином и со свободным гликоколом вместо эфира гликокола, не показывает ни увеличения гликокола в белке, ни выделения из него аспарагиновой кислоты.

Внедрение в молекулу белка аминокислотных остатков гликокола и вытеснение аминокислотных остатков аспарагиновой кислоты, повидимому, происходит в отношениях, близких к стехиометрическим. Сходные в количественном отношении результаты были получены А. Г. Пасынским и Д. Л. Талмудом<sup>(7)</sup>, показавшими, что в присутствии трипсина

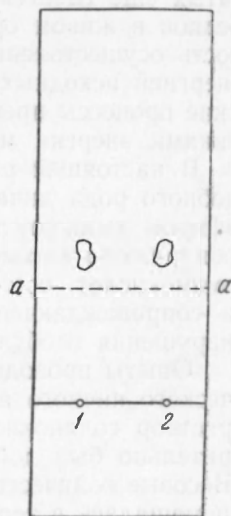


Рис. 2

под высоким давлением (5400 атм.) происходит внедрение фенилаланина в молекулу сывороточного альбумина с вытеснением из белка тирозина.

Полученные результаты указывают на существование такого типа взаимодействия, при котором в неденатурированном глобулярном белке происходит своеобразный обмен аминокислотами. За счет богатого энергией эфира гликокола совершается перенос гликокола на белок и вытеснение из белка аспарагиновой кислоты.

Важно отметить, что молекулярный вес продукта взаимодействия яичного альбумина с эфиром гликокола, вычисленный из измерений поверхностного давления в монослое<sup>(8)</sup>, не менялся по сравнению с исходным белком.

В свое время<sup>(9, 10)</sup> реакция между белком и эфиром гликокола подвергалась исследованию, которое, однако, не привело к пониманию механизма взаимодействия.

На основании проведенных экспериментов можно представить некоторые соображения о механизме взаимодействия глобулярного белка с эфиром аминокислоты. Первый этап взаимодействия состоит в поглощении («солюбилизации») этилового эфира гликокола белковой глобулой. Затем происходит процесс, напоминающий перезетерификацию, в результате которого остаток гликокола становится на место остатка аспарагиновой кислоты, а остаток аспарагиновой кислоты образует с этоксилом эфир. Этот эфир выходит из глобулы («десолибилизируется») в раствор и, подвергаясь гидролизу, переходит в свободную аспарагиновую кислоту. Таким образом, наряду с обычным гидролизом эфира гликокола происходит вовлечение некоторой части эфира в процесс взаимодействия его с белком.

Схема этих превращений может быть представлена в следующем виде:

1.  $г^+ + H_2O \rightarrow г + C_2H_5OH.$
2.  $г^+ + б \rightleftharpoons бг^+.$
3.  $бг^+ \rightleftharpoons бга^+.$
4.  $бга^+ \rightarrow бг + а^+.$
5.  $а^+ + H_2O \rightarrow а + C_2H_5OH.$

Здесь г — гликокол; г<sup>+</sup> — этиловый эфир гликокола; б — белок; а — аспарагиновая кислота; а<sup>+</sup> — этиловый эфир аспарагиновой кислоты.

Число остатков аспарагиновой кислоты, вытесненных из одной молекулы белка, превышает число возможных концевых остатков в молекуле яичного альбумина. Понять это явление можно только на основе некоторых дополнительных предположений. Повидимому, полимерные мицеллы белка гораздо более лабильны, чем это принято думать.

Для ряда глобулярных белков с большой вероятностью доказано, что белковая глобула состоит из нескольких полимерных макромолекул. Обменные реакции создают то «поликонденсационное равновесие»<sup>(1)</sup> между макромолекулами одной и той же глобулы, которое определяет строение образующихся макромолекул и лабильность отдельных аминокислотных остатков, образующих макромолекулу. На основе этих предположений легко представить себе изменяемость концевых аминокислотных остатков, а следовательно, и возможность вытеснения остатков одной и той же аминокислоты, число которых превышает число имеющихся в глобуле концевых остатков.

Авторы приносят благодарность Г. А. Деборину и Л. Б. Горбачевой за измерение молекулярного веса белков и В. П. Блохиной за снятие распределительных хроматограмм.

Поступило  
23 II 1953

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> В. В. Коршак, Г. Н. Челнокова, Г. И. Дистлер, ДАН, **82**, 589 (1952); В. В. Коршак, В. А. Замятина, Изв. АН СССР, ОХН, 609 (1945). <sup>2</sup> R. Schoenheimer, The Dynamic State of Body Constituents, 1942. <sup>3</sup> H. Fraenkel-Conrat, M. Corper, J. Biol. Chem., **154**, 239 (1944). <sup>4</sup> L. Hagdahl, A. Tiselius, Nature, **170**, 799 (1952). <sup>5</sup> L. K. Christensen, C. R. Lab. Carlsberg, sér. chim., **28**, 85 (1952). <sup>6</sup> R. Kueger, Helv. Chim. Acta, **32**, 239 (1949). <sup>7</sup> А. Г. Пасынский, Д. Л. Талмуд, ДАН, **85**, 1361 (1952). <sup>8</sup> Г. А. Деборин, ДАН, **67**, 889 (1949). <sup>9</sup> Д. Л. Талмуд, ДАН, **20**, 153 (1938). <sup>10</sup> N. Gräén, T. Svedberg, Nature, **143**, 519 (1939).