

УДК 541.64:542.952/.954

**ПОЛИОКСИЭТИЛЕНОВЫЙ ЭФИР N-БЕНЗОИЛГИСТИДИНА
КАК МОДЕЛЬ АССОЦИИРУЮЩЕГО АЛЛОСТЕРИЧЕСКОГО
ФЕРМЕНТА**

***И. Н. Топчиеva, А. Б. Соловьева, Б. И. Курганов,
В. А. Кабанов***

В работе [1] нами была изучена температурная зависимость скорости гидролиза *n*-нитрофенилацетата (НФА), катализируемой полиоксиэтиленовым эфиром N-бензоилгистидина (ПОБГ). Существенным результатом этой работы явилось обнаружение чувствительности химических свойств полимерного катализатора (ПК) к конформационным превращениям, происходящим при изменении температуры. Эти превращения связаны с изменением вклада неполярных (гидрофобных) взаимодействий в стабилизацию тех или иных конформаций. Не меньший интерес представляет исследование влияния pH среды, а также субстрата, продукта реакции и различных веществ на конформационное состояние ПК и, следовательно, эффективность его действия. Цель настоящей работы — изучение конформационных переходов в ПОБГ, происходящих при изменении pH, под действием НФА и продукта реакции — *n*-нитрофенола (НФ) и приводящих к изменению катализитических свойств ПК.

Экспериментальная часть

Синтез ПОБГ. ПОБГ синтезировали по методу получения сложных эфиров, описанному в работе [2]. К суспензии 1,5 г (10^{-4} M) полиоксиэтилена (фирмы Schuchardt, ФРГ; молекулярный вес 15 000) в абсолютном CCl_4 добавляли 50 мг ($2 \cdot 10^{-4}$ M) бензоилгистидина и 60 мг ($4 \cdot 10^{-4}$ M) *n*-толуолсульфокислоты. В процессе реакции производили азеотропную отгонку воды. После прекращения отгонки растворитель упаривали на роторном испарителе, сухой остаток растворяли в воде, и полученный раствор пропускали через колонку с сефадексом G-25. Контроль за ходом разделения проводили с помощью бумажной хроматографии. Пятна проявляли реагентом Паули. Водные фракции, содержащие ПОБГ, упаривали на роторном испарителе досуха и высушивали полученный полимер в вакууме. В работе использовали несколько препаратов ПОБГ с различным содержанием имидазольных групп (от 35 до 10% от общего числа концевых групп).

Гидролиз НФА. Гидролиз НФА в присутствии ПК изучали в *tris*-HCl-буфере при 25°. НФА вводили в реакционную смесь в виде раствора в ацетонитриле (содержание последнего в реакционной смеси 0,5 об.%). Определенную ионную силу раствора ($\mu = 0,01$) устанавливали добавлением NaCl. Скорость гидролиза определяли по выделению НФ, за образованием которого следили по нарастанию оптической плотности раствора при 400 мкм (если опыты проводили при $\text{pH} \geqslant 7$) или при 320 мкм (если опыты проводили при $\text{pH} < 7$) с помощью двухлучевого регистрирующего спектрофотометра Hitachi EPS-03 против соответствующего раствора НФА, не содержащего катализатора. Кинетические измерения проводили в четырехсантиметровой кварцевой кювете. Температуру поддерживали с точностью $\pm 0,2^\circ$.

Модификация имидазольных групп ПОБГ бромуксусной кислотой (БУК) и диазотированным раствором 5-амино-1-Н-тетразола (ДАТ). БУК (х.ч.) перекристаллизовывали из эфира (т. пл. 46°). Модификацию ПОБГ БУК проводили по методу, описанному в работе [3] в $2 \cdot 10^{-1}$ M *tris*-HCl-буфере при 25° в отсутствие и присутствии НФ при различных pH. Концентрация ПОБГ — $(5 - 10) \cdot 10^{-3}$, концентрация НФ — $(5 - 10) \cdot 10^{-3}$, а концентрация БУК — $(2,5 - 5) \cdot 10^{-2}$ M. Концентрацию имидазольных

групп определяли реакцией Паули, которую проводили непосредственно в реакционной смеси. Долю имидазольных групп рассчитывали по разности между содержанием имидазольных групп в исходном полимере и в продукте реакции модификации.

ДАТ получали, исходя из аминотетразола [4]. К раствору 5-амино-1-Н-тетразола ($10^{-2} M$) в воде прибавляли 3 мл концентрированной соляной кислоты и 7%-ный раствор нитрата натрия. Диазотирование вели при 0°. Полученный раствор после подщелачивания прибавляли к раствору ПОБГ в 0,2 M боратном буфере, смесь оставляли на 30 мин., затем фотометрировали при 480 мкм. В кювету сравнения помещали раствор ДАТ в боратном буфере. Для построения калибровочных кривых была снята зависимость оптической плотности продукта реакции ДАТ с N-бензоилгистидином от концентрации N-бензоилгистидина при разных рН.

Гель-фильтрация растворов ПОБГ и ПОЭ. Гель-фильтрацию полимеров проводили на колонке (4·75 см) с сефадексом G-200. Колонку предварительно уравновешивали 0,01 M фосфатным буфером, pH = 7,8. При хроматографировании ПОБГ в присутствии НФ для уравновешивания колонки использовали 0,01 M фосфатный буфер, содержащий $5 \cdot 10^{-4} M$ НФ. На колонку наносили (0,05 — 0,5 г) ПОБГ или ПОЭ в 1 — 5 мл фосфатного буфера. Полимеры элюировали с колонки фосфатным буфером или фосфатным буфером, содержащим НФ соответственно. Элюаты собирали с помощью коллектора фракций Radifac фирмы LKB (Швеция) и анализировали двумя способами: концентрацию ПОЭ определяли по изменению показателя преломления на дифракционном рефрактометре фирмы Shimadzu (Япония), концентрацию ПОБГ в элюате определяли реакцией Паули.

Седиментация ПОБГ и ПОЭ в ультрацентрифуге. Молекулярный вес полимеров рассчитывали, пользуясь формулой Сведберга [5]

$$M = S_0 RT / D_0 (1 - \bar{v} \rho_0),$$

где S_0 — константа седиментации; D_0 — коэффициент диффузии; \bar{v} — парциальный удельный объем и ρ_0 — плотность растворителя.

Константу седиментации и коэффициент диффузии определяли из данных скоростной седиментации образцов ПОБГ и ПОЭ в 0,01 M *тристо-НCl*-буфере при pH = 7,8 в аналитической ультрацентрифуге Spinco E. При этом концентрации полимеров изменились в интервалах ПОЭ 0,25 — 1; ПОБГ — 0,05 — 1 вес. %. Для каждой концентрации полимеров определяли коэффициент диффузии и константу седиментации; из полученных результатов экстраполяцией к нулевой концентрации полимеров находили D_0 и S_0 . Опыты проводили в ячейке с искусственной границей при 20°. Парциальные удельные объемы образцов ПОБГ и ПОЭ, определенные в фосфатном буфере, при pH = 7,8, оказались практически одинаковыми и равными $0,85 \text{ см}^3/\text{г}$.

Результаты и их обсуждение

Гидролиз НФА в присутствии ПОБГ изучали в интервале pH от 7 до 9 в *тристо-НCl*-буфере. Типичные кинетические кривые гидролиза НФА приведены на рис. 1. Первое, что обращает на себя внимание — наличие индукционных периодов на кинетических кривых, вслед за которыми образование НФ происходит линейно во времени (стационарный участок). При повышении pH от 7 до 7,8 величина индукционного периода τ_i * убывает, достигает минимальной величины при pH = 7,8, а при дальнейшем увеличении pH вновь начинает расти (рис. 2). При этом скорость, соответствующая стационарному участку, растет с увеличением pH.

Ранее нами было показано, что реакция модификации имидазольных групп в ПОБГ 2,4-динитрофторбензолом (ДНФБ) может быть использована для нахождения доли активных имидазольных групп β в ПОБГ [1]. В настоящей работе величины β при различных pH были найдены путем измерения доли имидазольных групп, доступных действию другого модификатора — БУК. Целесообразность выбора последнего реагента обусловлена его инертностью по отношению к буферному раствору в широком диапазоне значений pH и хорошей растворимостью в воде (ДНФБ не может быть использован в качестве модификатора имидазольных групп при pH = 8 в *тристо-НCl*-буфере вследствие того, что его реакция с трисом становится преобладающей). Следует отметить, что при pH < 8 оба модификатора дают близкие по величине значения β . Наиболее чувствительным модифицирующим агентом имидазольных групп является ДАТ, с помощью которого содержание активных имидазольных групп можно определять,

* За τ_i принимали отрезок, отсекаемый продолжением стационарного участка кинетической кривой на нулевой линии ($\Delta D = 0$).

используя катализитические концентрации ПОБГ. (При модификации БУК и ДНФБ концентрации ПОБГ превышают катализитические на два порядка.)

Оказалось, что при использовании трех модификаторов, величина α для ПОБГ, содержащего 35% концевых имидазольных групп, имеет примерно одно и то же значение, равное 30% от общего содержания имидазольных групп (или $30 \cdot 35/100 = 10,5\%$ от общего числа концевых групп в ПОБГ), и не зависит от концентрации ПОБГ и pH среды. Можно допустить, что

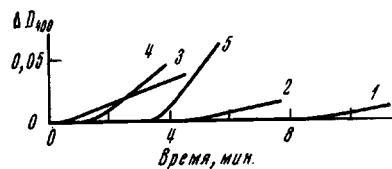


Рис. 1

Рис. 1. Кинетические кривые гидролиза НФА в присутствии ПОБГ, содержащего 35% имидазольных групп, в $10^{-2} M$ трис-HCl-буфере при $pH = 7,0$ (1); 7,4 (2); 7,8 (3); 8,4 (4) и 9,0 (5); 25°; концентрация субстрата $2,4 \cdot 10^{-4} M$; ПОБГ — $3,2 \cdot 10^{-5} M$

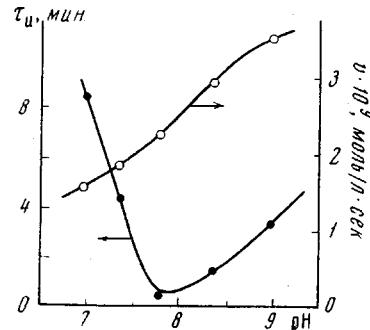


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость величины индукционного периода τ_i и скорости на стационарном участке кинетической кривой v от pH. Условия те же, что и на рис. 1

доля модифицируемых имидазольных групп соответствует доле имидазольных групп, принимающих участие в катализитическом процессе.

Для выяснения причины появления индукционных периодов на кинетических кривых гидролиза НФА были изучены зависимости величины индукционного периода от концентрации субстрата (НФА) и продукта реакции (НФ) для ПОБГ, содержащего 35% имидазольных групп. Оказалось, что увеличение концентрации НФА приводит к уменьшению τ_i и при концентрациях НФА, больших $4 \cdot 10^{-4} M$, индукционный период на кинетических кривых практически отсутствует (рис. 3).

Влияние добавленного НФ на τ_i было изучено в связи с тем, что ускорение катализитического процесса могло быть связано с действием НФ, накапливающегося в результате спонтанного гидролиза НФА. Из рис. 4 видно, что НФ действительно снижает τ_i , причем для выявления максимального эффекта необходима преинкубация в течение 10 мин. (или более). Кинетические кривые гидролиза НФА, катализируемого ПОБГ, который перед внесением НФА инкубировали 10 мин. с различными концентрациями НФ, представлены на рис. 5, а, из которого видно, что достаточно большие концентрации НФ полностью снимают индукционный период. Вместе с тем скорость процесса на стационарном участке кинетической кривой остается практически неизменной при внесении в систему НФ. На рис. 5, б представлены зависимости τ_i от концентрации добавленного НФ при двух фиксированных начальных концентрациях НФА (10^{-4} и $2,8 \cdot 10^{-4} M$). Таким образом, НФ также вызывает переход ПК из неактивной формы в активную.

На основании изучения зависимости τ_i от концентрации НФА и НФ можно предположить, что как субстрат, так и продукт реакции оказывают влияние на физическое состояние ПК в реакционной системе. Для выяснения вопроса о том, какое же из этих соединений главным образом ответ-

ствено за изменение состояния катализатора в ходе реакции, мы сопоставили концентрации НФ, накапливающегося в реакционной системе за время индукционного периода в результате спонтанного гидролиза субстрата, с концентрациями, вызывающими изменение τ_i . Если учесть, что константа скорости спонтанного гидролиза НФА при $pH = 9,0$ составляет $1,59 \cdot 10^{-4}$ сек $^{-1}$ (25°), то расчеты показывают, что концентрация НФ в точках излома кинетических кривых не превышает $7 \cdot 10^{-6} M$ для любой из изученных концентраций НФА (10^{-4} — $5 \cdot 10^{-4} M$) (рис. 3). Из рис. 5, б видно, что в таких малых концентрациях (до $7 \cdot 10^{-6} M$) НФ не может оказать заметного влияния на τ_i (т. е. вызвать переход неактивной формы ПК в активную). Поэтому следует полагать, что наличие индукционного периода на кинетических кривых гидролиза НФА, катализируемого ПОБГ, связано с переходом ПОБГ из неактивной формы в активную под действием самого субстрата и что скорость перехода растет с увеличением концентрации субстрата.

Возможность существования полимерного катализатора в активной и неактивной формах в зависимости от условий проведения катализической реакции гидролиза НФА (pH среды, концентраций НФА и НФ) может быть обусловлена либо конформационными переходами в молекуле ПК, либо ассоциацией полимерных молекул. Очевидно, что выбор в пользу внутри- или межмолекулярного механизма активации может быть сделан на основе изучения кинетического поведения системы при различных концентрациях полимерного катализатора. С этой целью нами были изучены зависимости индукционного периода и скорости гидролиза НФА от концентрации ПОБГ. Из рисунка 6, а видно, что величина τ_i падает с уменьшением концентрации ПОБГ и становится близкой к нулю при достижении некоторой критической концентрации. При переходе от $pH = 7,8$ к 9,0 происходит уменьшение этой критической концентрации ПОБГ. В то же время удельная активность (скорость катализической реакции, отнесенная к концентрации имидазольных групп ($v / [Im]_0$)), остается неизменной при варьировании концентрации ПОБГ. То обстоятельство, что величина τ_i зависит от концентрации катализатора, указывает на существенную роль межмолекулярных взаимодействий ПК в области исследованных концентраций. Логично предположить, что появление индукционного периода выше некоторой критической концентрации ПОБГ связано с образованием ассоциатов полимерных молекул, в которых имидазольные группы не могут проявлять катализической активности из-за стерических ограничений. Если это предположение верно, то критическая концентрация ПОБГ характеризует способность ПК к ассоциации. Уменьшение критической концентрации ПОБГ при переходе от $pH = 7,8$ к $pH = 9,0$ указывает на то, что при $pH = 9,0$ склонность ПОБГ к ассоциации выражена сильнее, чем при 7,8. Можно полагать далее, что наличие индукционного периода на кинетических кривых связано с переходом неактивных ассоциатов в активную мономерную форму и что скорость на стационарном участке характеризует катализическую активность ПК, находящегося целиком в мономерной форме. С этим предположением согласуется постоянство удельной активности ПОБГ при варьировании концентрации ПК.

Из рис. 6, б, в видно, что увеличение концентрации НФА и НФ приводит к увеличению критической концентрации ПОБГ и, следовательно, к стабилизации катализически активной мономерной формы. В согласии с вышеуказанными данными удельная активность остается постоянной во всех интервалах изученных концентраций ПОБГ.

Особый интерес представляло изучить зависимость удельной активности ПОБГ от концентрации ПОБГ для препаратов катализаторов с различным содержанием имидазольных групп. Увеличение содержания имидазольных групп приводит к уменьшению критической концентрации ассоциации (ККА) ПОБГ (рис. 7, а). Зависимость обратной величины ККА, выраженной через концентрацию имидазольных групп, от степени замещения p

представлена на рис. 7, б в логарифмических координатах. Тангенс угла наклона прямой в этих координатах равен примерно двум (при одинаковом масштабе осей). Следовательно, способность ПОБГ к ассоциации расстет пропорционально квадрату содержания имидазольных групп. Поскольку концентрация цепей ПОЭ, в котором обе концевые гидроксильные группы замещены остатками N-бензоилгистидина, также пропорциональна

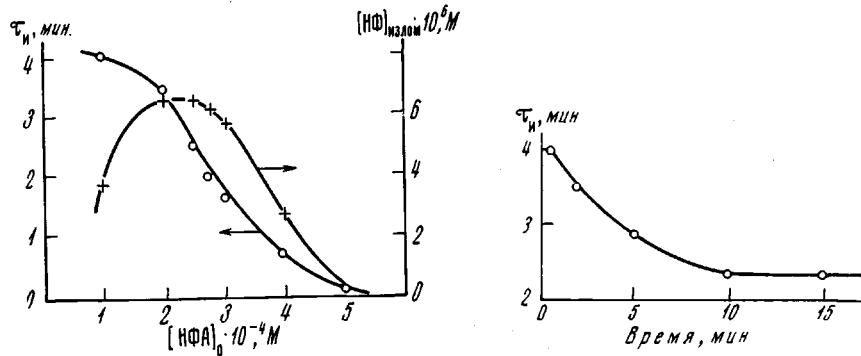


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость τ_n и концентрации НФ в точке излома кинетической кривой $[HFA]_{\text{излом}}$ от концентрации НФА. Концентрация ПОБГ, содержащего 35% имидазольных групп, $3.2 \cdot 10^{-5} M$; $pH = 9.0$

Рис. 4. Зависимость τ_n от времени преинкубации ПОБГ с НФ ($3.5 \cdot 10^{-5} M$) перед внесением в реакционную систему НФА. $pH = 9.0$; концентрация НФА 10^{-4} ; ПОБГ, содержащего 20% имидазольных групп, $3.2 \cdot 10^{-5} M$

Рис. 4

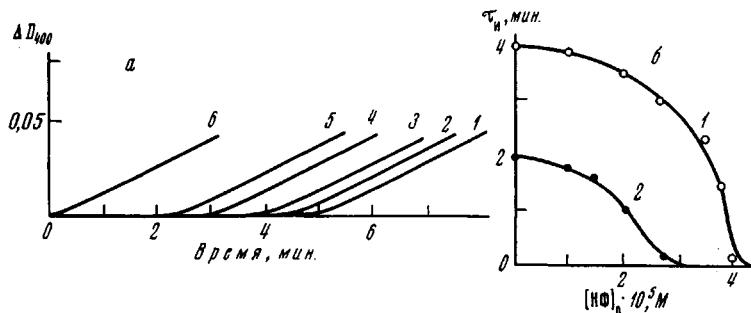


Рис. 5. Кинетические кривые гидролиза НФА в присутствии добавленного НФ (а) и зависимость τ_n от концентрации НФ (б) при $pH = 9.0$:

а — концентрация ПОБГ, содержащего 35% имидазольных групп, $3.2 \cdot 10^{-5} M$; концентрация НФ · 10^{-5} : 1 — 0; 2 — 2.5; 3 — 3.0; 4 — 3.5; 5 — 4.0;
б — концентрация НФА $10^{-4} M$; б — концентрация НФА 10^{-4} (1) и $2.8 \cdot 10^{-4} M$ (2); концентрация ПОБГ, содержащего 20% имидазольных групп, $3.2 \cdot 10^{-5} M$. ПОБГ инкубировали 10 мин. перед внесением НФА

квадрату содержания имидазольных групп, можно предположить, что ассоциация ПОБГ определяется, в первую очередь, содержанием двухзамещенных полиоксиэтиленовых цепей.

На рис. 8, а представлена зависимость удельной активности ПОБГ от процентного содержания имидазольных групп в ПОБГ. Увеличение $v / [Im]_0$ с ростом содержания концевых имидазольных групп связано, по-видимому, с тем, что катализическая активность двухзамещенных полимерных цепей выше соответствующей величины для монозамещенных. В общем случае величина $v / [Im]_0$ должна включать два слагаемых:

$$\frac{v}{[Im]_0} = \left\{ \frac{v}{[Im]_0} \right\}_1 2p(1-p) + \left\{ \frac{v}{[Im]_0} \right\}_2 p^2 =$$

$$= \left\{ \frac{v}{[Im]_0} \right\}_1 2p - \left\{ \frac{v}{[Im]_0} \right\}_1 p^2 + \left\{ \frac{v}{[Im]_0} \right\}_2 p^2 \quad (1)$$

где $\{v / [Im]_0\}_1$ и $\{v / [Im]_0\}_2$ — удельные активности моно- и дизамещенных соответственно, а p — доля концевых групп полиоксиэтилена, замещенных остатками N-бензоилгистидина. При $\{v / [Im]_0\}_1 = 0$ выражение (1) упрощается

$$\left\{ \frac{v}{[Im]_0} \right\} = \left\{ \frac{v}{[Im]_0} \right\}_2 p^2 \quad (2)$$

Экспериментально найденная зависимость $v / [Im]_0$ от содержания имидазольных групп в логарифмических координатах имеет наклон, равный

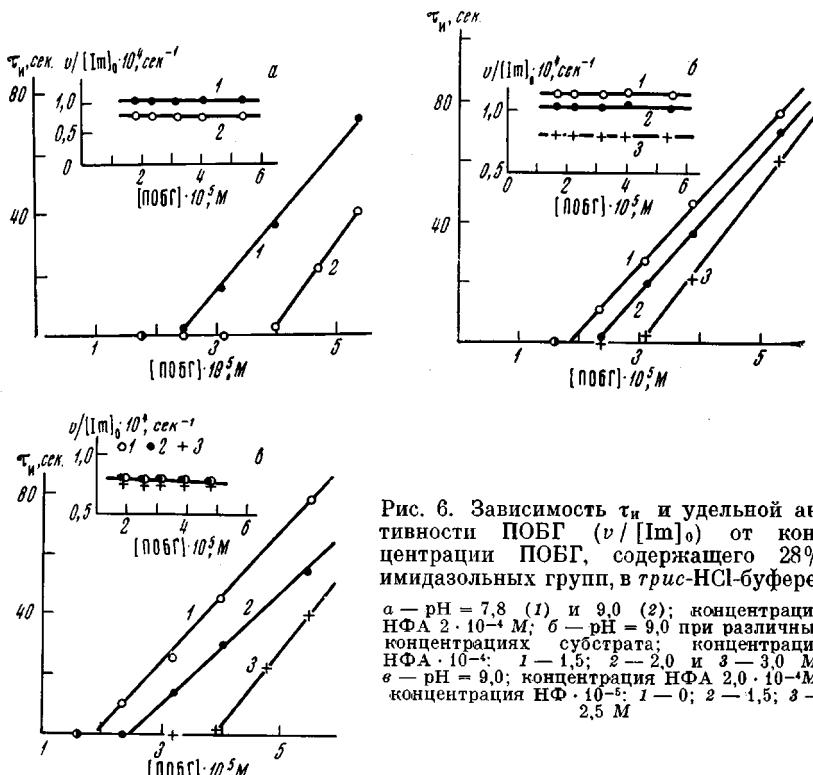


Рис. 6. Зависимость τ_n и удельной активности ПОБГ ($v / [Im]_0$) от концентрации ПОБГ, содержащего 28% имидазольных групп, в *трис*-HCl-буфере:

a — pH = 7,8 (1) и 9,0 (2); концентрация НФА $2 \cdot 10^{-4}$ M; *б* — pH = 9,0 при различных концентрациях субстрата; концентрация НФА $\cdot 10^{-4}$: 1 — 1,5; 2 — 2,0 и 3 — 3,0 M; *в* — pH = 9,0; концентрация НФА $2,0 \cdot 10^{-4}$ M; концентрация НФ $\cdot 10^{-5}$: 1 — 0; 2 — 1,5; 3 — 2,5 M

примерно двум (рис. 8, б), что, очевидно, соответствует частному случаю, описываемому выражением (2). Следовательно, в данной системе катализической активностью обладают только двузамещенные полиоксиэтиленовые цепи, удельная катализическая активность которых составляет $7,6 \cdot 10^{-4}$ сек^{-1} . Заметим, что эта величина соответствует концентрации НФА $1,5 \cdot 10^{-4}$ M. Если отнести величину удельной катализической активности двузамещенных полиоксиэтиленовых цепей к концентрации субстрата, то мы получим величину $5,1 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$, которая не зависит от концентрации субстрата. В связи с тем, что гидролиз НФА, катализируемый ПОБГ, описывается схемой Михаэлиса — Ментен [1] и использованная концентрация субстрата мала по сравнению с константой Михаэлиса, полученная величина представляет собой отношение k_2 / K_m . Для оценки эффективности полимерного катализатора (дизамещенных цепей ПОЭ) по сравнению с низкомолекулярным аналогом — метиловым эфиром N-бензоилгистидина значение удельной катализической активности дизамещенных цепей ПОЭ было отнесено к константе скорости второго порядка гидролиза НФА, катализируемого метиловым эфиром N-бензоилгистидина

($0,5 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$). Полученная величина составляет ~ 10 и согласуется по порядку величины с соответствующим отношением, полученным при изучении гидролиза НФА в присутствии ПОБГ.

Для подтверждения способности ПОБГ к ассоциации были поставлены опыты по гель-фильтрации ПОБГ на колонке с сефадексом G-200, уравновешенной фосфатным буфером, $pH = 7,8$. Кривая 1 на рис. 9 представляет собой хроматограмму ПОЭ (количество ПОЭ составляет 500 мг). Концентрацию ПОЭ в элюате определяли методом дифференциальной рефрактометрии. ПОБГ, нанесенный в том же количестве (500 мг), выходит гораздо раньше (кривая 2). Контроль за выходом ПОБГ из колонки осуществляли с помощью количественного определения имидазольных групп по реакции Паули. Эти данные указывают на то, что молекулярный вес ПОБГ

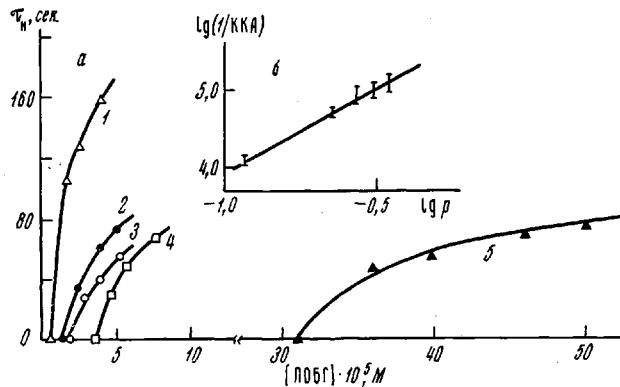


Рис. 7. Зависимость t_i от концентрации ПОБГ для препаратов ПОБГ с содержанием имидазольных групп $0,35$ (1); $0,31$ (2); $0,28$ (3); $0,23$ (4) и $0,12$ (5) (а) и обратного значения ККА от p в логарифмических координатах (б)

Фосфатный буфер: $pH = 7,8$, концентрация НФА $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ М}$. За нижний предел ККА принятая наибольшая концентрация имидазольных групп, при которой t_i равен 0, а верхний предел соответствует следующей за ней концентрации, при которой t_i отличен от нуля

существенно превышает молекулярный вес ПОЭ, и, следовательно, ПОБГ при достаточно больших концентрациях действительно образует ассоциаты. Характер гель-хроматограммы для ПОБГ, нанесенного в меньшем количестве (65 мг), свидетельствует о том, что в этих условиях ПОБГ ассоциирован в меньшей степени (кривая 3). В то время как ПОБГ, нанесенный в количестве 500 мг , выходит практически одним пиком, гель-хроматограмма того же полимера, нанесенного в количестве 65 мг , состоит из пика, совпадающего по положению с пиком ПОЭ и соответствующего, следовательно, мономерной форме ПК, и широкого плато в области, соответствующей выходу более высокомолекулярных ассоциатов. Эти результаты указывают на обратимый характер ассоциации ПОБГ, степень которой растет с увеличением концентрации полимера.

Представляло интерес изучить гель-фильтрацию ПОБГ в присутствии НФ, который согласно кинетическим данным препятствует ассоциации ПОБГ. Однако существенных различий между гель-хроматограммами ПОБГ в присутствии НФ (кривая 4) и без него (кривая 3) обнаружить не удалось.

Была изучена также гель-фильтрация ПОБГ в присутствии $3,6 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ ПОЭ (количество нанесенного ПОБГ 105 мг). Оказалось, что положение пика ПОБГ не меняется при внесении в систему ПОЭ.

Дополнительные подтверждения ассоциации ПОБГ были получены при изучении скоростной седиментации ПОБГ, содержащего 35% имидазольных групп, в ультрацентрифуге Spinco, модель E. Интервалы изученных

концентраций полимеров составляли $0,25-1,12$ вес.% ($1,7 \cdot 10^{-4}$ — $7,5 \cdot 10^{-4} M$) для ПОЭ и $0,05-1,12$ вес.% ($3,7 \cdot 10^{-5}$ — $7,5 \cdot 10^{-4} M$) для ПОБГ. Заметим, что все использованные концентрации ПОБГ превышают величину ККА для ПОБГ с данным процентом замещения. Как для ПОЭ, так и для ПОБГ пики на седиментограммах имели симметричный вид. Значения коэффициентов седиментации при различных концентрациях ПОЭ и ПОБГ представлены в табл. 1.

Коэффициенты седиментации для ПОБГ выше, чем для ПОЭ, что указывает на ассоциацию ПОБГ. То обстоятельство, что коэффициент седиментации ПОБГ уменьшается с ростом концентрации полимера, по-видимому, свидетельствует о том, что в изученном интервале концентраций размер ассоциатов является предельным и не меняется при увеличении концентрации ПК. В табл. 2 представлены рассчитанные на основании табл. 1 предельные значения коэффициентов седиментации S_0 и диффузии D_0 . Молекулярный вес ПОЭ, определенный по формуле Сведберга, оказался равным 14 000 (по данным фирмы Schuchardt, молекулярный вес ПОЭ равен 15 000). Средний молекулярный вес ПОБГ, содержащего 35% имидазольных групп, составил 26 000.

Таблица 1
Концентрационные зависимости коэффициентов седиментации ПОЭ и ПОБГ содержащего 35% имидазольных групп, в *tris-HCl*-буфере, pH = 7,8, 20°

Концентрация полимера, вес. %	$S_{20} \cdot 10^{13}$ см/сек·дин	
	для ПОЭ	для ПОБГ
0,037	—	0,41
0,074	—	0,40
0,25	0,32	—
0,67	0,34	0,32
1,12	0,34	0,30

Таблица 2
Предельные коэффициенты седиментации, диффузии и молекулярный вес ПОЭ и ПОБГ

Полимер	$S_0 \cdot 10^{15}$, см/сек·дин	$D_0 \cdot 10^2$, см/сек	$M \cdot 10^{-4}$
ПОЭ	$0,32 \pm 0,01$	2,75	$1,5 \pm 0,05$
ПОБГ	$0,41 \pm 0,01$	2,50	$2,6 \pm 0,05$

сильными группами и непрореагировавшего обратной величины ККА и удельной активности ПК квадрату процентного содержания имидазольных групп в ПОБГ указывает на то, что только двузамещенные полиоксиэтиленовые цепи обладают, во-первых, каталитической активностью, во-вторых, способны к ассоциации. Чем же объясняются столь существенные различия в кинетическом поведении моно- и дизамещенных полиоксиэтиленовых эфиров N-бензоилгистидина? По-видимому, отсутствие каталитических свойств монозамещенного соединения может объясняться только стерической недоступностью имидазольных групп по отношению к молекулам субстрата, находящимся внутри полимерной глобулы. Это, в свою очередь, может быть обусловлено сворачиванием полимерного клубка, происходящим в результате неполярного взаимодействия между гидрофобной бензоильной группой и $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ группами ПОЭ и сопровождающимся выталкиванием молекул воды, гидратирующей эфирные группы полимерной цепи. Это предположение подтверждается тем, что концевые гидроксильные группы молекул незамещенного ПОЭ легко модифицируются различными агентами [6].

Наличие каталитической активности у дизамещенных молекул ПОБГ указывает на существенно отличное конформационное состояние этих макромолекул. По-видимому, неполярное взаимодействие двух бензоилгистидиновых группировок в ПК приводит к тому, что они оказываются на поверхности клубка в непосредственной близости друг от друга. Следствием

этого является появление катализитической активности в реакции гидролиза НФА. Если наши предположения о пространственном расположении имидазольных групп в моно- и дизамещенном ПОЭ справедливы, то при модификации имидазольных групп в ПОБГ должны реагировать только имидазольные группы дизамещенных ПОЭ. С этим заключением согласуется тот экспериментальный факт, что при модификации ПОБГ со степенью замещения 35% модифицируется 10% от общего числа концевых групп в ПОБГ. Эта величина близка к доле дизамещенных ПОЭ (12%).

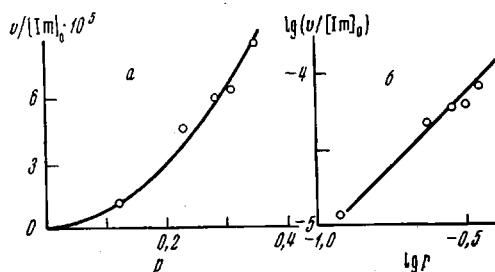


Рис. 8

Рис. 8. Зависимость удельной активности ПОБГ: *a* — от содержания имидазольных групп в фосфатном буфере, pH = 7,8 при концентрации НФА $1,5 \cdot 10^{-4} M$; *b* — то же в логарифмических координатах

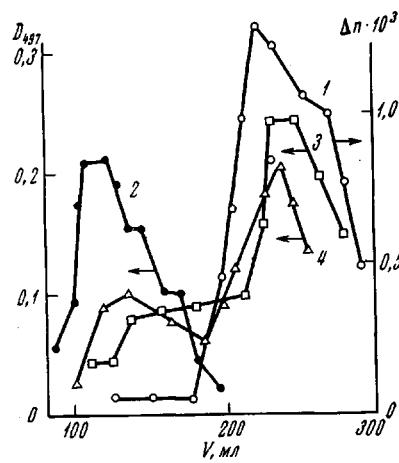


Рис. 9

Рис. 9. Гель-хроматограмма ПОЭ и ПОБГ, содержащего 25% имидазольных групп, на колонке с сефадексом G-200 (фосфатный буфер, pH = 7,8); 500 мг ПОЭ (1); 500 (2) и 65 мг ПОБГ (3, 4) на колонке, уравновешенной $5 \cdot 10^{-4} M$ НФ

Ось абсцисс соответствует объему элюата (мл); левая ось ординат — оптической плотности продукта диазотирования имидазольных групп в ПОБГ реагентом Паули при $\lambda = 497$ мкм; правая ось ординат — показанию дифференциального рефрактометра, пропорционального концентрации ПОЭ

Величина β не зависит от степени ассоциации ПОБГ, на что указывает постоянство этой величины при варьировании pH или концентрации ПОБГ. Это является дополнительным подтверждением обратимости процесса ассоциации.

Бензоилгистидиновая группировка, находящаяся на поверхности полимерной молекулы, обладает гидрофобными свойствами и в силу этого стремится уменьшить контакт с водой за счет слипания с аналогичной группировкой другой макромолекулы. Подобным образом избыток гидрофобных аминокислот в белках приводит к ассоциации белковых молекул [7].

Предложенная нами конформационная модель дизамещенных ПОЭ предполагает наличие одного центра ассоциации в молекуле. Можно предположить, что насыщение этого центра происходит при образовании ассоциата, содержащего несколько цепей двузамещенных ПОЭ. Такие ассоциаты можно рассматривать как мицеллы, ядро которых составляют бензоильные группы, а гидрофильной частью являются полиоксиэтиленовые цепи. Отсутствие катализитической активности у ассоциатов дизамещенных ПОЭ может быть объяснено стерической недоступностью имидазольных групп по отношению к субстрату. Резкие изломы на кинетических кривых и кривых зависимости $\tau_{\text{н}}$ от концентрации катализатора указывают, по-видимому, на то, что ассоциаты являются более сложными образованиями, чем димер.

Данные по гель-фильтрации ПОБГ на сефадексе G-200 при различных концентрациях полимера указывают на то, что при достаточно больших концентрациях ПОБГ все замещенные (как моно-, так и ди-) бензоилгисти-

диновыми группами полиоксиэтиленовые цепи оказываются в составе ассоциатов. Таким образом, ассоциаты ПОБГ являются сложными системами, включающими как моно-, так и дизамещенные полиоксиэтиленовые цепи. Однако следует подчеркнуть, что движущей силой ассоциации является взаимодействие дизамещенных цепей ПОЭ.

Следовательно, на основании полученных данных можно видеть, что ПОБГ представляет собой полимерный катализатор, поведение которого отчетливо зависит от природы концевых групп, влияющих на ассоциацию и конформационное состояние макромолекул.

Из представленных в настоящей работе данных следует, что НФА и НФ повышают каталитическую эффективность ПОБГ, вызывая диссоциацию неактивных ассоциатов на активные мономеры. Активация каталитического процесса в присутствии добавок НФ, как следует из кинетических опытов, состоит не в изменении каталитических свойств ПК, а происходит за счет увеличения доступных субстрату имидазольных групп. Таким образом, НФ оказывает косвенное действие на каталитический центр, опосредованное изменением степени ассоциации ПК. Вещества, действующие подобным образом, получили в энзимологии название «аллостерических эффекторов», а тип регуляции, осуществляемый ими — «аллостерической регуляции» (см. обзоры [8—11]). Действие НФА на ПК также состоит в изменении физического состояния ПК и, таким образом, субстрат также можно рассматривать как аллостерический эффектор. Взаимодействие аллостерических центров, т. е. центров, связывающих аллостерический эффектор, в молекуле аллостерического фермента приводит к необычной кооперативной кинетике — S-образным кривым зависимости скорости ферментативной реакции от начальной концентрации эффектора. Подобные кооперативные эффекты были обнаружены нами при изучении зависимости τ_a от концентрации НФА и добавленного в реакционную систему НФ. Вид кривых зависимости τ_a от концентрации НФА и НФ указывает, что переход ПОБГ из неактивного состояния в активное под действием НФА или НФ происходит кооперативно. Кооперативные эффекты в системах ПОБГ+НФА и ПОБГ+НФ возможны благодаря тому, что полиоксиэтиленовая цепь содержит достаточно много центров, связывающих НФА и НФ. Смещение равновесия активный мономер \rightleftharpoons неактивный ассоциат под действием НФА или НФ в сторону образования мономерной формы, обладающей большим сродством к лиганду, означает, что сродство ПК к НФА и НФ растет по мере заполнения связывающих центров. Таким образом, кооперативные взаимодействия центров, связывающих НФА и НФ, опосредуются смещением равновесия между олигомерными формами ПОБГ. Из рис. 5, б видно, что с увеличением концентрации НФА эффективность действия НФ возрастает: при концентрации НФА $10^{-4} M$ τ_a снижается вдвое при концентрации НФ, равной $3,5 \cdot 10^{-5} M$, а в случае $2,8 \cdot 10^{-4} M$ НФА — при концентрации НФ, равной $2,1 \cdot 10^{-5} M$. Эти данные указывают на синергизм действия НФА и НФ. Следовательно, НФА и НФ связываются на различных центрах.

Интересно отметить, что явление активации субстратом полимерного катализатора, приводящее к увеличению скорости процесса по мере его протекания, встречается и в ферментативном катализе. В качестве примера можно указать на треониндегидратазу из *Clostridium tetanomorphum* [12] и аденоzinмонофосфат-аминогидролазу из скелетных мышц кролика [13]. В первом случае субстрат — треонин — вызывает агрегацию неактивных субъединиц фермента в активный олигомер, причем скорость агрегации растет с увеличением концентрации субстрата.

Одним из возможных механизмов аллостерических взаимодействий в регуляторных ферментах является механизм, в основе которого лежит изменение степени диссоциации регуляторных ферментов под действием аллостерических эффекторов [14—18]. В работе [15] были разработаны методические подходы для обнаружения подобного механизма аллостери-

ческих взаимодействий, построенные на анализе кривых зависимости ферментативной реакции от концентрации фермента в присутствии различных концентраций субстратов и эффекторов. Подобный подход, а именно, изучение характера зависимости $\tau_{\text{и}}$ от концентрации ПОБГ при различных концентрациях НФА и НФ, позволил нам сделать вывод о том, что субстрат и продукт реакции вызывают диссоциацию неактивных ассоциатов ПК.

Следует подчеркнуть, что величина $\tau_{\text{и}}$ является по существу катализитической меткой, обеспечивающей простой и удобный метод контроля за олигомерным состоянием ПК. В то же время, величина стационарной скорости катализитического гидролиза НФА характеризует катализическую активность ПК, полностью перешедшего в мономерную форму. В случае диссоциирующих регуляторных ферментов катализитической меткой на олигомерное состояние может служить скорость ферментативной реакции [19]. Например, уменьшение активности фосфорилазы Б из скелетных мышц кролика в присутствии аллостерического эффектора — аденоzin-5'-монофосфата — отражает переход активной димерной формы фермента в неактивную тетрамерную [20]. Этот пример интересен тем, что как и при ассоциации дизамещенных ПОЭ, образование тетрамерной формы фосфорилазы Б сопровождается стерическим экранированием двух активных центров в каждом димере. Другим общим свойством этих систем является соизмеримость скоростей установления равновесия между олигомерными формами ПК или фермента и скоростью катализитического процесса. (В случае ПОБГ это видно из сопоставления данных, представленных на рис. 1 и 4.) В подобных системах действие эффектора может проявиться в полной мере лишь после предварительной инкубации его с ПК или ферментом.

Какие же свойства ферментов моделирует изученный нами ПК? По эффективности катализитического действия ПОБГ несущественно превышает низкомолекулярные катализаторы и в этом отношении далек от ферментов. В то же время способность ПК к образованию ассоциатов приводит к появлению у него регуляторных свойств, обусловленных возможностью перехода неактивных ассоциатов в активные мономеры под действием субстрата и продукта реакции. Следовательно, подобную полимерную систему можно рассматривать как модель ассоциирующего аллостерического фермента.

Что касается характера связывания НФ и НФА ПК, то, очевидно, можно полагать, что в случае НФ основной вклад могут давать ион-дипольные и неполярные взаимодействия между *n*-нитрофенолят-анионом ($pK = 7,0$) и полимерной цепью, а связывание субстрата происходит главным образом за счет неполярных взаимодействий. Эти предположения согласуются с литературными данными о специфическом взаимодействии фенолов с полиоксиэтиленовой цепью за счет образования водородной связи между эфирными кислородами ПОЭ и фенольным водородом [21], а также о ион-дипольных взаимодействиях между неорганическими ионами и ПОЭ [22].

Выражаем глубокую благодарность В. Я. Черняку за помощь при проведении седиментационных измерений.

Выводы

1. Показано, что полиоксиэтиленовый эфир N-бензоилгистидина в водных растворах представляет собой полимерный катализатор, поведение которого отчетливо зависит от природы концевых групп, влияющих на ассоциацию и конформационное состояние макромолекул.

2. Кинетические кривые гидролиза *n*-нитрофенилацетата, катализируемого полиоксиэтиленовым эфиром N-бензоилгистидина, характеризуется наличием индукционного периода $\tau_{\text{и}}$. Величина $\tau_{\text{и}}$ в интервале pH от 7 до 9 проходит через минимум при pH = 7,8. В то же время величина стационарной скорости процесса гидролиза, соответствующая линейному участку кинетической кривой, следующему за индукционным периодом, монотонно растет в изученном интервале pH.

3. Показано, что при увеличении концентрации *n*-нитрофенилацетата и введении добавок *n*-нитрофенола происходит уменьшение величины индукционного периода вплоть до его полного исчезновения при достаточно больших концентрациях *n*-нитрофенилацетата и *n*-нитрофенола. Вид кривых зависимости $\tau_{\text{и}}$ от концентраций *n*-нитрофенилацетата и *n*-нитрофенола указывает на кооперативный характер перехода полиоксиэтиленового эфира N-бензоилгистидина из неактивного состояния в активное под действием *n*-нитрофенилацетата и *n*-нитрофенола.

4. Величина индукционного периода падает при уменьшении концентрации полиоксиэтиленового эфира N-бензоилгистидина, обращаясь в нуль при некоторой критической концентрации катализатора. В то же время удельная каталитическая активность полиоксиэтиленового эфира N-бензоилгистидина (отношение стационарной скорости к концентрации имидазольных групп в полимере) остается неизменной при варьировании концентрации катализатора.

6. Методами гель-фильтрации и седиментации в ультрацентрифуге показано, что в отличие от полиоксиэтилена, полиоксиэтиленовый эфир N-бензоилгистидина способен образовывать ассоциаты.

7. На основании совокупности полученных данных сделан вывод, что монозамещенные полиоксиэтиленовые цепи не обладают каталитической активностью и не способны вступать в реакцию модификации с бромуксусной кислотой и диазотированным 5-амино-1-Н-тетразолом вследствие стерической недоступности имидазольных групп по отношению к субстрату и модификатору. В дизамещенных полиоксиэтиленовых цепях обе имидазольные группы оказываются на поверхности полимерной молекулы, что обеспечивает каталитическую активность и способность их к модификации. Характерным свойством дизамещенных полиоксиэтиленовых цепей является их способность к образованию неактивных ассоциатов за счет неполярных взаимодействий бензоильных остатков при концентрациях полиоксиэтиленового эфира N-бензоилгистидина, превышающих критическую концентрацию ассоциации.

8. Активирующее действие *n*-нитрофенилацетата и *n*-нитрофенола связано с их способностью вызывать распад неактивных ассоциатов на активные мономеры. Следовательно, *n*-нитрофенилацетат и *n*-нитрофенол выступают в роли аллостерических активаторов. Предполагается, что индукционные периоды на кинетических кривых гидролиза *n*-нитрофенилацетата обусловлены протекающим во времени переходом молекулы полимерного катализатора из неактивной формы в активную под действием *n*-нитрофенилацетата (аллостерический переход).

Московский
государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию
21 VIII 1970

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Б. Соловьева, И. Н. Топчиева, В. А. Кабанов, В. А. Каргин, Докл. АН СССР, 187, 850, 1969.
2. Э. Шредер, К. Любке, Пептиды, т. I, изд-во «Мир», 1967, стр. 96.
3. S. Koghan, H. T. Clarke, J. Biol. Chem., 221, 113, 1956.
4. T. Noginishi, V. Hashimori, Biochem. Biophys. Acta, 86, 477, 1964.
5. В. Н. Цветков, В. Е. Эскин, С. Я. Френкель, Структура макромолекул в растворе, изд-во «Наука», 1964, стр. 124.
6. И. Н. Топчиева, В. А. Кабанов, Высокомолек. соед., A12, 542, 1970.
7. H. Fisher, Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 1285, 1964.
8. E. R. Stadtman, Advances Enzymol., 28, 41, 1966.
9. D. E. Atkinson, Ann. Rev. Biochem., 35, 85, 1966.
10. D. E. Koshland, Jr., K. E. Neet, Ann. Rev. Biochem., 37, 359, 1968.
11. Б. И. Курганов, Итоги наук, серия «Биохимия», ВИНИТИ, 1970.
12. A. Vanquickenborne, A. T. Phillips, J. Biol. Chem., 243, 1312, 1968.
13. C. H. Suelter, A. L. Kovacs, E. Antonini, FEBS Letters, 2, 65, 1968.
14. Б. И. Курганов, Химия и технол. полимеров, 11, 140, 1967.
15. Б. И. Курганов, Молек. биол., 2, 430, 1968.

16. C. Frieden, R. F. Colman, J. Biol. Chem., **242**, 1705, 1967.
 17. C. Frieden, J. Biol. Chem., **242**, 4045, 1967.
 18. L. W. Nichol, W. J. H. Jackson, D. J. Winzor, Biochemistry, **6**, 2449, 1967.
 19. Б. И. Курганов, Молек. биол., **1**, 17, 1967.
 20. Г. В. Сылонова, Б. И. Курганов, Молек. биол., **4**, 445, 1970.
 21. B. A. Mulley, A. D. Metcalf, J. Pharm. and Pharmacol., **8**, 774, 1956
 22. F. E. Bailey, R. W. Callard, J. Appl. Polymer Sci., **1**, 56, 1959.
-

N-BENZOYLHISTIDINE POLYOXYETHYLENE ESTER AS A MODEL OF ASSOCIATING ALLOSTERIC FERMENT

I. N. Topchieva, A. B. Solov'eva, B. I. Kurganov, V. A. Kabanov

Summary

The properties of a polymeric catalyst N-benzoylhistidine polyoxyethylene ester (BPE) in aqueous solutions have been studied. It is shown that its behavior depends on the nature of the end groups which affect the association and the conformation state of a macromolecule. Unlike polyoxyethylene, BPE can form associates. On the basis of the data obtained, it is concluded that monosubstituted polyoxyethylene chains do not show catalytic activity and do not enter into a modification reaction with bromoacetic acid and diazotized 5-amino-l-H-tetrazole on account of steric inaccessibility of imidazole groups to substrate and modifier molecules. On the other hand, in disubstituted polyoxyethylene chains both imidazole groups are on the polymer molecule surface, which ensures catalytic activity and capacity for quantitative modification. A characteristic property of disubstituted polyoxyethylene chains is their ability to form inactive associates through nonpolar interactions of benzoyl residues at BPE concentrations exceeding the critical concentration of association. It is also shown that *p*-nitrophenyl acetate and *p*-nitrophenol have an activating effect on the polymeric catalyst connected with their ability to cause the breaking up of inactive associates into active monomers. This peculiarity of the catalytic system studied is responsible for the regulating properties of the polymeric catalyst. Therefore, such a polymeric system can be treated as a model of associating allosteric ferment.
