

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 541.64:547.96

ИНГИБИРОВАНИЕ ЛИЗОЦИМА ФОСФОРИЛИРОВАННОЙ
АЛЬГИНОВОЙ КИСЛОТОЙ*Н. П. Кузнецова, Г. М. Зарубинский, Г. В. Самсонов*

Изучение взаимодействий полиэлектролитов является одной из основных проблем в исследовании биохимических процессов. В данном сообщении приведены результаты исследования связывания лизоцима с полисахаридом, несущим карбоксильные и фосфорные группы, и изучено влияние такого комплексообразования на литическую активность белка. Известно, что полианионы [1] могут ингибиовать активность лизоцима из-за нейтрализации его основности. Взаимодействие лизоцима с дезоксирибонуклеиновой кислотой [2] приводит к образованию двух типов комплексов: продуктивных (с сохранением активности) и непродуктивных, где активность лизоцима ингибируется. Аналогичные данные получены по связыванию лизоцима с олигосахаридами [3] и хитином [4, 5].

Экспериментальная часть

Использовали лизоцим белка куриного яйца (Олайн), дополнительного очищенный фракционированием на сефадексе Г-50 в 0,1 M уксусной кислоте и лиофилизованный.

Водорастворимую фосфорилированную альгиновую кислоту (ФАК) получали действием POCl_3 при 0° в токе азота на альгинат натрия ($M=5 \cdot 10^4$), предварительно обработанный 20-кратным (по весу) 50%-ным раствором KOH. После полного растворения геля раствор нейтрализовали разбавленной уксусной кислотой до слабокислой реакции. Продукт дважды переосаждали в метанол, диялизовали его водный раствор против воды и лиофилизовали. Дополнительное фракционирование проводили на сефадексе Г-50 в 0,1 M NH_4OH , лиофилизовали, получали ФАК с содержанием фосфора ~2%, т. е. с одним остатком фосфорной кислоты на 8–10 звеньев альгиновой кислоты.

Активность лизоцима определяли по лизису бактериальных полисахаридов *Micrococcus lysodeikticus* [6]. Бактериальные клетки растирали с буфером. Интенсивность светорассеяния полученной суспензии оставалась постоянной в течение нескольких часов. Для измерения активности при pH 7,8 использовали 0,02 M фосфатный буфер (ионная сила $\mu=0,06$), а при pH 9,5–0,04 M аммонийный буфер ($\mu=0,04$), что согласуется с данными Дэви [7]. Кинетические кривые лизиса бактериальных полисахаридов лизоцимом и его комплексами с ФАК снимали на спектрофотометре марки «Hitachi» с автоматической записью. Степень лизиса оценивали по уменьшению рассеяния света суспензией субстрата при $\lambda=440$ нм. Исследовали только прямолинейные начальные участки кинетических кривых, снятые в течение 1,5–2 мин.

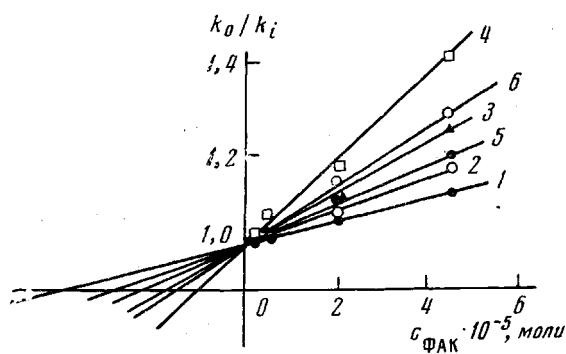


Рис. 1. Зависимость отношения констант скоростей от концентрации ФАК для комплексов типа I при 5 (1); 22 (2); 37 (3); 46° (4) и для комплексов типа II при 5 (5); 22° (6) (рН 7,8)

К 2,5 мл супензии субстрата добавляли 0,05 мл раствора лизоцима или комплекса (белка 10 г, т. е. 10^{-5} г). Литическую активность лизоцима в комплексе определяли по отношению к активности свободного лизоцима в тех же условиях. Кинетические кривые при низких температурах были сняты для охлажденных до 5–6° супензий субстрата и растворов лизоцима или комплексов, образованных при 5–6°. Для температур 37–60° комплексы, образованные при 20°, помещали на 20 мин. в термостат с заданной температурой. Кинетические кривые снимали при комнатной температуре. Для свободной ФАК изменений светорассеяния во времени во всех изученных условиях не наблюдали.

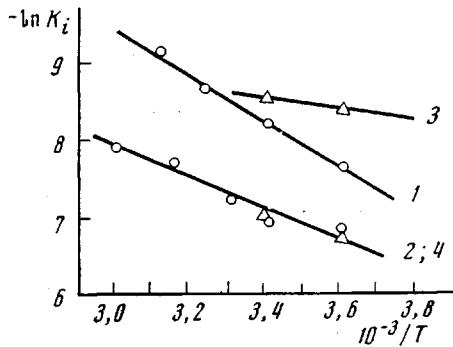


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость $-\ln K_i$ от $1/T$ для комплексов типов I (1, 2) и II (3, 4) при pH 7,8 (1, 3) и 9,5 (2, 4)

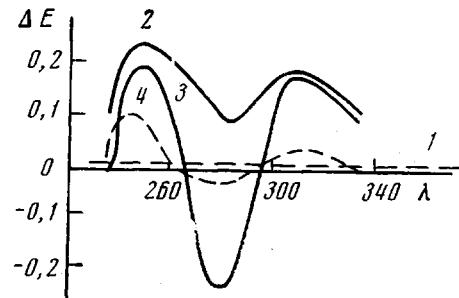


Рис. 3

Рис. 3. Дифференциальные УФ-спектры комплексов лизоцим – ФАК относительно лизоцима, снятые при pH 7,8, для типов I(1) и II при весовых соотношениях лизоцим : ФАК = 1 : 9 (2) и 1 : 1 (3). Для сравнения дан дифференциальный спектр тирозина (pH 13–6) (4) [10]

Комплексы готовили слиянием растворов белка и ФАК. При вариации соотношений компонентов сохраняли постоянными концентрацию белка и общий объем раствора. Исследовали два типа комплексов: тип I, инкубированный 3 часа, и тип II – 48 час.

Обсуждение результатов

Связывание лизоцима с ФАК сопровождается частичным ингибирированием литической активности, которое возрастает с увеличением концентрации ФАК. По ряду зависимостей (рис. 1), которые будут приведены ниже, ФАК, связанную с лизоцимом, можно считать конкурентным ингибитором для лизиса полисахаридов бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus* лизоцимом в комплексе. Мы пытались охарактеризовать комплексообразование лизоцим – ФАК по образованию непродуктивного комплекса, т. е. по ингибирированию литической активности белка. Хроматографически выделить комплексы не удалось, поскольку эта система легко диссоциирует в процессе хроматографии на исходные компоненты.

Считая реакцию ингибирирования лизоцима бимолекулярной, можно рассчитать константу скорости процесса по уравнению

$$k_i = \frac{1}{t[I]} \ln \frac{v_0}{v_t} [8],$$

где k_i – константа скорости, t – время, $[I]$ – концентрация ингибитора (ФАК), v_0 и v_t – скорости лизиса субстрата лизоцимом и комплексом лизоцим – ФАК соответственно.

При постоянной концентрации субстрата, заменив отношение скоростей лизиса отношением соответствующих констант скоростей, можно оценить величину константы ингибитора K_i , характеризующую непродуктивное

связывание ФАК с лизоцимом, сопровождающееся с понижением активности

$$\frac{k_0}{k_i} = 1 + \frac{[I]}{K_i},$$

где k_0 — константа скорости лизиса субстрата лизоцимом.

Как известно, между соотношением скоростей и концентрацией ингибитора существует линейная зависимость, и по наклону прямой можно определить $1/K_i$. Как видно из рис. 1, все прямые пересекаются при $k_0/k_i=1$. Система лизоцим — ФАК, как упоминалось ранее, является обратимо диссоциирующей системой, поэтому равновесную константу связывания можно рассчитать по константе ингибирования, причем константа равновесия является величиной, обратной K_i [8], т. е.

$$\Delta\Phi = RT \ln K_i \quad \text{и} \quad \frac{d \ln K_i}{d(1/T)} = \frac{\Delta H}{R}$$

В таблице приведены термодинамические функции ингибирования активности лизоцима, связанного с ФАК.

Термодинамические функции ингибирования лизической активности лизоцима в комплексах с ФАК

Тип комплекса	$T, ^\circ\text{C}$	$K_i \cdot 10^4, M^{-1}$	$\ln K_i$	$\Delta\Phi$	ΔH	$T\Delta S$	$\Delta S, э. ед.$
					кал/моль	кал/моль	
pH 7,8							
I	5	3,75	-7,7	-4300	-5900	-1300	-4,5
	22	2,55	-8,3	-4900	-5900	-800	-2,6
	37	1,7	-8,7	-5400	-5900	-300	-1,0
	46	1,0	-9,2	-5800			
II	5	2,1	-8,5	-4700	-900	4000	14,0
	22	1,7	-8,6	-5100			
pH 9,5							
I	6	9,8	-6,9	-3900	-4000	0	0
	22	9,0	-7,0	-4100	-4000	300	1,0
	31	7,0	-7,29	-4400	-4000	700	2,2
	44	4,1	-7,78	-4900	-4000	1100	3,4
	60	3,5	-7,99	-5300			
II	6	11,0	-6,85	-3800	-4000	0	0
	22	7,9	-7,10	-4200			

Как видно из таблицы, изменения свободной энергии связывания для комплексов лизоцим — ФАК, образованных при pH 7,8 и 9,5, различаются мало; энталпийные составляющие равны -5900 и -4000 кал/моль соответственно (рис. 2). Значительный энергетический вклад в изменение свободной энергии процесса непродуктивного связывания обусловлен, по-видимому, образованием солевых связей [9]. Величины энтропийного члена не вносят существенных изменений в протекание процесса комплексообразования. Однако в ходе инкубации существенную роль в связывании начинает играть изменение энтропии системы (таблица, комплекс типа II), что можно объяснить увеличением числа микросостояний в процессе связывания двух полиэлектролитов. Подтверждением этому является изменение УФ-спектра лизоцима, появляющееся только после двухсуточной инкубации комплекса лизоцим — ФАК (рис. 3). Аналогичные дифференциальные спектры характерны для изменения степени ионизации тирозина от pH 13 до 6,0 [10].

Полученные дифференциальные спектры комплекса лизоцим – ФАК (тип II), следовательно, могут объясняться ионизацией гидроксильных групп тирозиновых остатков лизоцима [11] при связывании с ФАК. Термодинамически этот факт обусловливает очень сильное изменение энтропии системы.

Приносим глубокую благодарность Н. А. Кравченко за предоставленный субстрат *Micrococcus lysodeikticus*.

Институт высокомолекулярных соединений АН СССР

Поступила в редакцию
7 VI 1971

ЛИТЕРАТУРА

1. E. Nihoul, L. Massart, G. van Heel, Arch. Intern. Pharmacodynamic, 88, 123, 1951; Chem. Abstrs, 46, 1613, 1952.
2. D. Cattan, D. Bourgois, M. Yoly, Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 409, 1968.
3. I. A. Rupley, V. Gates, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 57, 496, 1967.
4. И. А. Черкасов, Н. А. Кравченко, Молек. биол., 1, 381, 1967.
5. T. Imoto, K. Hayashi, M. Funatsu, J. Biochem., 64, 387, 1968.
6. A. L. N. Prasad, G. Litwack, Analyt. Biochem., 6, 328, 1963.
7. R. C. Davies, A. Neuberger, B. M. Wilson, Biochem. Biophys. Acta, 178, 294, 1969.
8. В. А. Яковлев, Кинетика ферментативного катализа, «Наука», 1965.
9. I. A. Rupley, L. Butler, M. Gerring, F. J. Hartdegen, R. Pecoraro, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 57, 1088, 1967.
10. D. B. Wetlauffer, Advances Protein Chem., 17, 303, 1962.
11. T. Tojo, K. Nagamichi, M. Imanishi, T. Amano, J. Biochem., 60, 538, 1966.

УДК 541.64:547.333

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПЛЕКСОНЫ НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРОВ ВИНИЛПИРРОЛИДОНА И ВИНИЛАМИНА

*Л. И. Тихонова, О. И. Самойлова, Е. Ф. Панарин,
В. Г. Яшунский*

В настоящее время изучено большое число мономерных комплексонов различного строения – производных α -аминоуксусных кислот, обладающих способностью образовывать прочные водорастворимые комплексы со многими катионами металлов. Не меньший интерес представляют комплексы на полимерной основе. Однако описанные в литературе высокомолекулярные полиаминополиуксусные кислоты, в основном ионообменные смолы [1, 2], плохо растворимы в воде, что может ограничить их применение.

С целью получения водорастворимых полимерных комплексообразователей нами осуществлен синтез двух производных иминодиуксусной кислоты на основе сополимеров виниламина (ВА) и винилпирролидона (ВП) с мольным соотношением ВА : ВП = 1 : 1, $M \approx 4000$ (комплексон I) и 100 000 (комплексон II). Потенциометрическим методом при ионной силе 0,1 (NaNO_3) и 20° изучены их кислотно-основные свойства и определены константы диссоциации.

Экспериментальная часть

Комплексоны I и II синтезированы обработкой исходных сополимеров ВП и ВА [3] избыткомmonoхлоруксусной кислоты в щелочной среде при 80–90°. Выделение комплексонов проводили электродиализом с мембранными МА-40 и МК-40 при рабочем напряжении 70 в. Из 8,52 г сополимера получено 9,25 г комплексона I, из того же количества сополимера синтезировано 8,8 г комплексона II. Каждый комплексон содержал одну молекулу кристаллизационной воды.

Найдено, %: для I С 50,24; Н 7,22; для II С 50,35; Н 6,97. $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Вычислено, %: С 50,0; Н 7,0.

Потенциометрическое титрование проводили на pH-метре ЛПУ-01 под азотом с предварительно прокалиброванными стеклянным и каломельным электродами. Все вещества очищали перекристаллизацией; NaOH (х.ч.) освобождали от CO_2 . Титровали водные растворы полимерных кислот ($2 \cdot 10^{-3}$ и $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л) в 0,1 моль/л NaNO_3 0,1 н. раствором NaOH в 0,1 моль/л NaNO_3 . В первой области нейтрализации титровали обычным способом, во второй – по методике «ступенчатого титрования», т. е. после каждого добавления щелочи растворы перемешивали в течение 3–5 дней до установления равновесия [4].