

УДК 541(64+183.12)

**ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БЕЛКА
НА ЕГО СВЯЗЫВАНИЕ С КАРБОКСИЛЬНЫМИ
КАТИОНИТАМИ**

*Шатаева Л.К., Крейер В.Г., Покровская С.С.,
Радзявилюс К.И., Самсонов Г.В.*

На примере высокопроницаемых карбоксильных катионитов изучено образование полизелектролитных комплексов с белками, различающимися своим аминокислотным составом и кислотно-основными характеристиками. Методом потенциометрического титрования изучена ионизация карбоксильных групп катионита на основе метакриловой кислоты в присутствии связанных белков. Показано, что сорбция белков щелочной природы сопровождается понижением диссоциации карбоксильных групп полизелектролита. Комплекс катионита с белком щелочной природы в области устойчивости обладает повышенной сорбционной емкостью по отношению к другим белкам.

Известно, что белки с различными электрохимическими характеристиками имеют разные области рН для селективного связывания с высокопроницаемыми полизелектролитными сетками [1]. Можно предполагать, что механизм такого обратимого взаимодействия белкового цвиттер-иона с сетчатым полизелектролитом аналогичен механизмам образования комплексов поликатион — полianiон для растворимых полизелектролитов [2, 3] и комплексов белков с растворимыми полизелектролитами [4, 5].

В данной работе изучены закономерности связывания различных белковых макромолекул с карбоксильными катионитами на основе акриловой (КМ-2п) и метакриловой (КМТ) кислот. Потенциометрическое титрование комплексов катионита КМТ с различными белками использовано для изучения влияния природы белковой макромолекулы на кислотные характеристики полизелектролита.

В работе использовали карбоксильный катионит КМТ, синтезированный на основе метакриловой кислоты и гексагидро-1,3,5-триакрилоилтриазина, сорбционные свойства которого описаны ранее [1], и механически измельченный макропористый карбоксильный катионит КМ-2п, содержащий звенья акриловой кислоты, структура и свойства которого были предварительно изучены [6]. Оба сорбента имели зернение 0,1–0,35 мм и использовались в водородной форме.

Для изучения закономерностей сорбции белков на этих катионитах применяли кристаллический пепсин производства НПО «Биохимреактив», кристаллический инсулин производства завода медпрепаратов Ленинградского комбината, химотрипсиноген-А фирмы «Сигма», лизоцим фирмы «Реанал», высокоочищенный электрофоретически гомогенный препарат поли-эндо-галактуроназы из *Fabospora macedoniensis*, полученный из ВНИИ виноделия и виноградарства «Магарач», высокоочищенный электрофоретически гомогенный препарат субтилизиноподобной щелочной протеиназы из *Str. sphaeroides*, полученный на кафедре микробиологии МГУ [7].

Сорбцию белков при различных значениях рН проводили в статических условиях из буферных 0,05 M растворов при начальной концентрации белка 0,5–2,5 мг/мл по методу [6]. Концентрацию белков в растворе определяли по методу Бредфорд [8]. Коэффициент распределения белка k_i между фазой ионита и равновесным раствором рассчитывали по начальному углу наклона изотермы сорбции при малых заполнениях катионита белком.

При оптимальном значении рН инсулин, химотрипсиноген и протеиназу сорбировали на водородной форме катионита КМТ в статических условиях из раствора объемом 0,5 л с начальными концентрациями белков 2,8; 5,0 и 1,2 мг/мл соответственно. Для сорбции каждого белка брали 5 г катионита в расчете на сухой сополимер в водородной форме. Сорбция проходила в течение 1 сут при перемешивании. Затем сорбент со связанным белком отделяли от раствора, помещали в колонку и

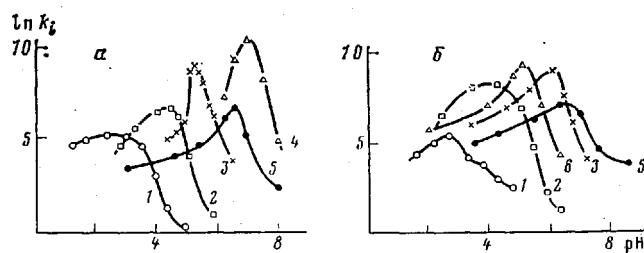


Рис. 1. Селективность сорбции пепсина (1), полигалактуроназы (2), химотрипсиногена (3), лизоцима (4), субтилизиноподобной щелочной протеиназы (5) и инсулина (6) на катионитах КМ-2п (а) и КМТ (б)

промывали дистиллированной водой до отсутствия следов белка в промывных водах. Отмытый белково-полимерный комплекс лиофильно высушивали, определяли остаточную влажность и использовали для потенциометрического титрования. Количество связанного белка определяли независимо по десорбции в колонке 0,5 М раствором ацетат-аммонийного буфера при pH 10,2.

Титрование комплексов проводили при концентрации хлористого натрия 0,1 н.; титрование в кислую область осуществляли 0,2 н. раствором соляной кислоты, титрование в щелочную область — 0,2 н. раствором натриевой щелочи по методу [6]. После установления равновесия (70–100 ч) в каждом флааконе измеряли pH и концентрацию белка в растворе. В контрольном опыте титровали свободный катионит КМТ.

Комплекс КМТ — протеиназа использовали также для изучения сорбции на нем других белков в статических условиях по той же методике, по которой определяли pH-зависимость сорбции белков на свободном катионите.

В табл. 1 представлены данные о количестве положительных и отрицательных ионогенных групп на макромолекулах исследованных белков, рассчитанные по известному аминокислотному составу этих белков. Содержание отрицательных ионогенных групп рассчитано как сумма концевых карбоксильных групп, аспарагиновой и глютаминовой аминокислот за вычетом их амидированных форм. Тирозин в расчет не принимали, так как его ионизация наблюдается за пределами изученного диапазона значений pH сорбции. Суммарное количество положительных ионогенных групп на макромолекуле белка рассчитывали по количеству аргинина, лизина, гистидина и концевых аминогрупп; амиды аспарагиновой и глютаминовой кислот не учитывались. В третьей графе представлены значения мольной гидрофобности белковых макромолекул, вычисленные как суммарная величина гидрофобности аминокислот с нейтральными боковыми группами по шкале гидрофобности, использованной Маршеллом [13].

На рис. 1 представлены pH-зависимости коэффициентов распределения белков с различными изоэлектрическими точками на катионитах КМ-2п и КМТ соответственно. Эти катиониты различаются кислотностью карбоксильных групп (звенья акриловой и метакриловой кислот): $pK_{\text{карб}} = 6,0$ для КМ-2п и 6,7 для КМТ. Для этих катионитов наблюдаются близкие по

Таблица 1
Физико-химические характеристики белковых макромолекул

Белок	$M \cdot 10^{-3}$	Мольная гидрофобность, кДж/моль	Количество ионогенных групп, экв/моль		Изоэлектрическая точка pH	Литература
			положительные	отрицательные		
Пепсин	36	865	6	42	2,6 *	[9]
Инсулин	6	153	6	7	5,3	[10]
Полигалактуроназа	27	459	22	23	6,1	
α -Химотрипсиноген	25	642	22	15	9,1	[11]
Лизоцим	14	306	19	11	10,6	[12]
Щелочная протеиназа	26	460	22	16	11,0	[7]

* Среднее значение для изоформ, находящихся в препарате.

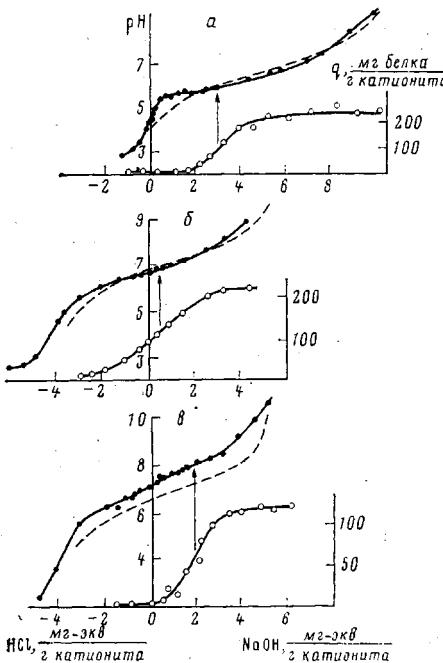


Рис. 2

Рис. 2. Потенциометрическое титрование комплексов инсулин - КМТ (а), химотрипсиноген - КМТ (б) и протеиназы (с). Штриховая линия - кривая титрования свободного катионита; темные точки - pH, светлые - q (количество белка, перешедшего из комплекса в раствор)

Рис. 3. pH-зависимости емкости сорбции пепсина ($c_0=1,5$ мг/мл) (а), инсулина ($c_0=0,6$ мг/мл) (б), полигалактуроназы ($c_0=1$ мг/мл) (в) и химотрипсиногена ($c_0=4$ мг/мл) (г) на катионите КМТ (1) и на комплексе протеиназа - КМТ (2)

форме зависимости сорбции белков от pH равновесного раствора, хотя для щелочных белков химотрипсиногена и протеиназы оптимум сорбции на катионите КМ-2п немного сдвинут в кислую область значений pH. Экстремальный характер pH-зависимости селективности связывания данных белков обнаруживает преимущественную роль полярных (ион-ионных и ион-дипольных) взаимодействий этих макромолекул с карбоксильными катионитами КМТ и КМ-2п. Гидрофобные свойства данных белков при взаимодействии с изучаемыми гибкоцепными полизэлектролитными сетками, по-видимому, не проявляются.

Междуд сорбционными центрами полизэлектролита и глобулярными цвиттер-ионами белков имеется два вида электростатических взаимодействий: притяжение положительно заряженных аминогрупп белка к кислотным группам полизэлектролита и отталкивание карбоксильных групп белка от ионизированных карбоксильных групп полимера. Изменение pH внешнего раствора влияет на соотношение положительных и отрицательных зарядов на макромолекуле белка в соответствии с их собственными константами ионизации. Соответственно изменяется величина сил притяжения и отталкивания. В щелочных областях значений pH раствора преобладает отталкивание белковых макромолекул от матрицы полизэлектролита, что обеспечивает обратимость связывания — полную десорбцию макромолекул в равновесный раствор.

В исследованном ряду белковых макромолекул (от пепсина к щелочной протеиназе) наблюдается постепенное увеличение числа и основности аминогрупп, так что с точки зрения образования полимер-полимерных комплексов в этом ряду должен наблюдаться постепенный переход механизма взаимодействия от кооперативной физической ассоциации к обратимой химической ассоциации [14].

Для изучения влияния аминокислотного состава белковой макромолекулы на прочность ее связывания с карбоксильным катионитом было про-

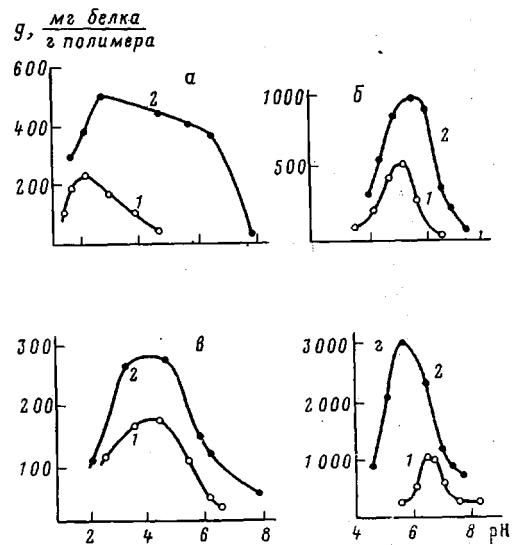


Рис. 3

Таблица 2

Состав и эквивалентная обменная емкость белково-полимерных комплексов

Комплекс, №	Состав	Содержание белка в комплексе		Емкость по титрованию, мг-экв/г комплекса			$pH_{дис}$
		мг/г комплекса	ммоль/г комплекса	аминогруппы белка	карбоксильные группы белка	карбоксильные группы катионита	
1	Инсулин – КМТ	260	0,043	0,26	0,3	7,0	6,1
2	Химотрипсиноген – КМТ	210	0,009	0,19	0,13	7,5	6,8
3	Протеиназа – КМТ	120	0,004	0,09	0,07	8,4	8,2
4	МТ	–	–	–	–	9,5	–

ведено потенциометрическое титрование белково-полимерных комплексов, свойства которых представлены в табл. 2.

На рис. 2 приведены кривые титрования белково-полимерных комплексов, которые показывают, что природа сорбированного белка существенно влияет на кислотные свойства полизэлектролита. При этом нужно отметить, что количество титруемых групп белка в изучаемых образцах мало по сравнению с обменной емкостью катионита и составляет 7, 4 и 1,8% от количества титруемых групп в комплексах 1, 2 и 3 соответственно.

В комплексе 1, который формируется практически на недиссоциированной карбоксилсодержащей матрице катионита, ионизация карбоксильных групп катионита понижается из-за присутствия белка (pH раствора увеличивается по сравнению со свободным катионитом) только на начальном участке кривой титрования, пока белок прочно связан с полизэлектролитом. При постепенном добавлении щелочи и повышении pH раствора комплекс диссоциирует и свободный белок переходит в раствор (количество десорбированного белка представлено на оси ординат справа). Однако количество щелочи, которое нужно добавить к системе, чтобы комплекс начал диссоциировать, значительно превосходит полную обменную емкость связанного инсулина (0,56 мг-экв/г катионита) и достигает 2,2–2,5 мг-экв/г катионита. По количеству десорбированного белка при каждом значении pH можно оценить $pH_{дис}$ комплекса, при котором степень связывания белка равна 0,5; на рис. 2 эти значения pH отмечены стрелкой.

Для комплексов 1 и 2 при достижении в ходе титрования $pH_{дис}$ катионит титруется далее как свободный полизэлектролит. Наибольшее искажение кислотных свойств полизэлектролита наблюдается в комплексе 3, для которого даже после $pH_{дис}$ титрование проходит при более высоких значениях pH , чем для свободного катионита. Собственная обменная емкость белка в этой системе составляет менее 2% обменной емкости комплекса и в пределах погрешности измерения не может быть обнаружена при использованном методе титрования. В то же время равновесное значение pH во всем диапазоне титрования комплекса 3 почти на единицу выше, чем для свободного сорбента. Можно предположить, что в этой системе значительную роль играют стехиометрические ион-ионные взаимодействия аминогрупп протеиназы с карбоксильными группами катионита (протеиназа содержит в структуре 10 аргининовых и четыре лизиновых остатка).

Известно, что при формировании полимер-полимерных комплексов наблюдается сильное взаимное влияние полизэлектролитов на кислотные и конформационные характеристики партнера по комплексу. Так, взаимодействие в комплексе поли-L-лизина с поликарболовой кислотой приводит к существенному смещению в кислую область pH конформационного перехода полиоснования [2]. В отличие от растворимых полизэлектролитов спиртовые полизэлектролитные сетки имеют ограниченную возможность к изменению конформации. Белковые макромолекулы в изученных системах также сохраняют свою нативную структуру. По-видимому, в данном случае присутствие белка влияет только на кислотные характеристики полизэлектролита. Комплекс протеиназы – КМТ остается устойчивым до pH 8,2.

Устойчивость комплекса в широком диапазоне рН позволила провести изучение его сорбционных свойств по отношению к другим белкам. На рис. 3 представлена зависимость сорбции пепсина, инсулина, полигалактуроназы, химотрипсиногена от pH раствора на свободном катионите и на комплексе З. Видно, что присутствие щелочного белка повышает сорбционные свойства катионита по отношению к другим белкам скорее всего за счет влияния на кислотные характеристики карбоксильных групп полимера. Нельзя также исключить и дополнительного взаимодействия между белками в этой тройной системе за счет гидрофобного фактора: наиболее гидрофобные макромолекулы (пепсин и химотрипсиноген) в наибольшей степени поглощаются комплексом по сравнению с сорбией на свободном сорбенте. Для данных белков наблюдается не только повышение емкости сорбции, но и значительное расширение pH-диапазона связывания белков кислой природы. Поскольку эти взаимодействия наблюдаются в кислой и нейтральной областях pH, где карбоксильные группы катионита КМТ сравнительно мало ионизированы, можно предположить, что ион-ионное взаимодействие (химическая ассоциация) части карбоксильных групп полиэлектролита с сильноосновными аминогруппами белка протеиназы усиливает способность недиссоциированных карбоксильных групп той же полиэлектролитной сетки к установлению нестехиометрических кооперативных взаимодействий (физической ассоциации) с другими макромолекулами, в том числе с цвиттер-ионами, несущими избыточный отрицательный заряд. По-видимому, в этом состоит причина понижения селективности связывания того или иного белка на карбоксильном катионите, когда сорбция происходит из сложной белковой смеси, содержащей также цвиттер-ионы и макромолекулы щелочной природы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шатаева Л. К., Орлиевская О. В., Джмухадзе Д. И., Самсонов Г. В. Высокомолек. соед. Б, 1975, т. 17, № 10, с. 735.
2. Рогачева В. Б., Зезин А. Б., Каргин В. А. Биофизика, 1970, т. 15, № 3, с. 389.
3. Харенко А. В., Калюжная Р. И., Зезин А. Б., Кабанов В. А. Высокомолек. соед. А, 1981, т. 23, № 12, с. 2657.
4. Кузнецова Н. П., Гликман М. В., Андреева И. А., Илларионова Н. Г., Волкова Л. А., Самсонов Г. В. Молек. биол., 1973, т. 7, № 1, с. 42.
5. Кабанов В. А., Евдаков В. П., Мустафаев М. И., Антипина А. Д. Молек. биол., 1977, т. 11, № 3, с. 582.
6. Радзывилюс К. И., Шатаева Л. К., Самсонов Г. В., Жукова Н. Г., Зорина А. И., Ласкорин Б. Н. Высокомолек. соед. А, 1982, т. 24, № 5, с. 1066.
7. Крейер В. Г., Ландай Н. С., Покровская С. С., Чернова И. А., Егоров Н. С. В кн.: Тез. докл. IV Всес. конф. «Методы получения и анализа биохимических препаратов». Рига: НИИТЭХИМ, 1982, с. 113.
8. Bradford M. M. Analyt. Biochem., 1976, v. 72, № 1–2, p. 248.
9. Rajagopalan T. G., Moore S., Stein W. N. J. Biol. Chem., 1966, v. 241, № 21, p. 4940.
10. Хаггис Дж., Миха И. В кн.: Введение в молекулярную биологию. М.: Мир. 1967.
11. Desnuelle P. In: The enzymes. N. Y.—L.: Acad. Press., 1961, v. 4, p. 93.
12. Phillips D. S. Scientific Amer., 1966, v. 215, № 5, p. 78.
13. Маршала Э. Биофизическая химия. М.: Мир, 1981, т. 1, с. 75.
14. Polderman A. Biopolymers, 1975, v. 14, № 10, p. 2181.

Институт высокомолекулярных
соединений АН СССР

Поступила в редакцию
3.V.1983

INFLUENCE OF AMINOACID COMPOSITION OF A PROTEIN ON ITS BINDING WITH CARBOXYLIC CATION-EXCHANGER

*Shataeva L. K., Kreiter V. G., Pokrovskaya S. S.,
Radzyavichyus K. I., Samsonov G. V.*

Summary

For high-permeable carboxylic cation-exchange the formation of polyelectrolyte complexes with proteins having various aminoacid composition and acidic-basic characteristics has been studied. Ionization of carboxyl groups of a cation-exchanger on the basis of methacrylic acid in the presence of binded proteins has been studied by potentiometric titration method. Sorption of proteins of the basic nature is shown to be accompanied by decrease of the degree of dissociation of carboxyl groups of polyelectrolyte. The complex of cation-exchange with such protein in the region of stability has higher sorptive capacity towards other proteins.