

УДК 541(64+183.12):532.77

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МОЛЕКУЛ БЕЛКА С ЛИНЕЙНЫМ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОМ В РАСТВОРЕ

Ануфриева Е. В., Паутов В. Д., Кузнецова Н. П., Лущик В. Б.,
Краковяк М. Г.

С помощью метода поляризованной люминесценции проведен анализ изменений динамических характеристик белковых глобул (лизоцима) и полимерных цепей полиметакриловой кислоты в воде и в водно-солевых растворах при образовании комплекса белок – полимер. Обнаружены участки полиметакриловой кислоты, заполненные компактно расположенным белком, и участки свободные от белка. Найдены условия формирования и структурные особенности, способствующие повышению стабильности комплекса белок – полиэлектролит.

Вопросы, связанные с образованием полимерных комплексов белков с синтетическими полиэлектролитами, представляют интерес как с точки зрения моделирования межмакромолекулярных взаимодействий при формировании биологических систем, так и для направленного проведения модификации свойств биологически активных соединений [1]. В работе [1] рассмотрены особенности строения надмолекулярных образований, возникающих в результате макромолекулярных реакций, природа сил, участвующих в образовании поликомплексов белков с синтетическими полиэлектролитами, а также факторы, стабилизирующие и разрушающие такие структуры.

Ранее изучали взаимодействие лизоцима с сетчатой полиметакриловой кислотой (ПМАК) определенного строения в водных растворах [2]. В настоящей работе обсуждается взаимодействие лизоцима с линейными цепями ПМАК в водных и в водно-солевых растворах.

При изучении взаимодействия лизоцима с сетчатой ПМАК в растворе было обнаружено, что динамические характеристики белка (подвижность макромолекулы как целого) и линейных фрагментов полимерной матрицы (внутримолекулярная подвижность) существенным образом изменяются при образовании комплекса [2]. Анализ изменений динамических характеристик белка и полимерной матрицы позволяет получить информацию об особенностях строения, условиях формирования и стабильности комплекса белок – полимер. Для этого необходимо определить времена релаксации каждого из компонентов комплекса, что возможно при последовательном выделении каждого из исследуемых компонентов комплекса с помощью метки. Использование люминесцирующих меток, связанных с полимером (белком) ковалентной связью, и метода поляризованной люминесценции [3–5] делает возможным определение времен релаксации, характеризующих подвижность белковых глобул в растворе и на полимерной матрице, и внутримолекулярную подвижность полимерной матрицы.

Метод поляризованной люминесценции использован в настоящей работе для изучения строения и стабильности полимерного комплекса лизоцима с линейной ПМАК. ММ полимера $3,5 \cdot 10^5$. Времена релаксации определяли методом поляризованной люминесценции [3–5], поляризация люминесценции измерена на установке, описанной в работе [3]. Меченный лизоцим и ПМАК с антраценсодержащими люминесцирующими группами получены по методам, описанным в работах [6, 7]. Содержание люминесцирующих меток в ПМАК $\sim 0,1$ мол. %, в лизоциме одна метка находится на 2–6 молекул белка.

Для определения состава комплекса были разработаны методы оценки доли молекул белка, связанных с ПМАК Φ_b , и доли участков ПМАК, несущих молекулы

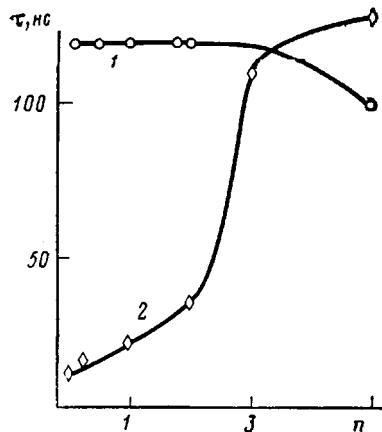


Рис. 1

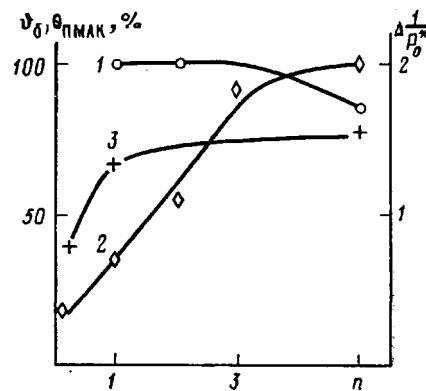


Рис. 2

Рис. 1. Времена релаксации τ , характеризующие подвижность белковых глобул в растворе ПМАК (1) и внутримолекулярную подвижность ПМАК (2) (для совокупности участков ПМАК свободных и заполненных белком) в зависимости от относительного содержания белка в растворе.

Рис. 2. Доля белковых глобул, связанных с ПМАК θ_B (1), и доля участков ПМАК, заполненных белком $\theta_{\text{ПМАК}}$ (2) при разном относительном содержании белка n в растворе. Показано также изменение поляризации люминесценции меченого белка, связанное с миграцией энергии электронного возбуждения ΔP_0^* (или компактности расположения белковых глобул на полимерной матрице ПМАК) (3)

белка $\theta_{\text{ПМАК}}$. Для определения доли связанных белка использовали соотношение $\theta_B = [(1/P_1 - 1/P) (1/P_2 + 1/3)] / [(1/P_1 - 1/P_2) (1/P + 1/3)]$, в котором θ_B — доля связанных меченого белка; P_1 — поляризация люминесценции раствора свободных меченых молекул белка; P_2 — поляризация люминесценции раствора полностью связанных с ПМАК меченых молекул белка; P — поляризация люминесценции исследуемого раствора. Соотношение следует из формулы, описывающей изменение поляризации люминесценции осцилляторов, участвующих в различных релаксационных процессах [5].

Для определения доли ПМАК в комплексе проанализировали изменение времен релаксации белка (при концентрации белка 0,5 мг/мл) и ПМАК (степень ионизации ПМАК $\alpha=0,4$) при увеличении n , где n — величина, показывающая, сколько молекул белка в растворе ПМАК приходится на 170 звеньев ПМАК (рис. 1).

Анализ показал, что при $n=1$ подвижность белковых глобул, связанных с ПМАК, существенно заторможена по сравнению со свободными белковыми глобулами (время релаксации $\tau=120$ и 18 нс соответственно), тогда как наблюдаемая подвижность ПМАК оказывается высокой ($\tau=16$ нс). Это различие может быть связано с тем, что только часть участков цепей ПМАК в растворе при $n=1$ заполнена белком, для них $\tau=120$ нс (значение τ ПМАК при больших n), а часть участков цепей ПМАК не заполнена белком, свободна. Для свободных цепей ПМАК при $\alpha=0,4$ $\tau=11$ нс. Действительно, свободные участки цепи ПМАК в растворе обнаруживаются с помощью полимерного индикатора, способного образовывать с ПМАК интерполимерный комплекс. В качестве полимерного индикатора был выбран поливинилпирролидон (ПВП).

Меченный ПВП вводили в раствор молекул белка и ПМАК, не содержащих метки. Предварительно было изучено взаимодействие ПВП со свободной ПМАК, с ПМАК, заполненной белком, со свободным белком и с комплексом белок — ПМАК¹ (таблица).

Неизменность величины $1/P$ люминесценции ПВП* в растворе белка означает, что он не взаимодействует с макромолекулами белка. Неизменность $1/P$ люминесценции раствора белка* в комплексе с ПМАК при добавлении немеченного ПВП означает, что ПВП не вытесняет белок из

¹ На наличие метки указывает верхняя звездочка у названия вещества.

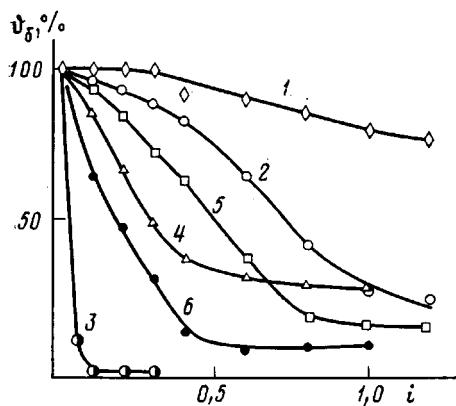


Рис. 3

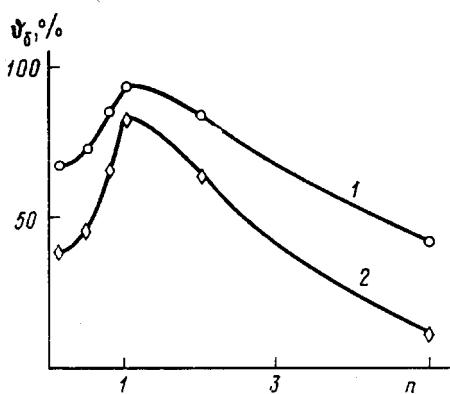


Рис. 4

Рис. 3. Влияние ионной силы раствора i (изменялась добавлением NaCl) на стабильность комплекса белок – ПМАК при одном и том же относительном содержании белка в растворе ($n=1$), но при разных $\alpha_{\text{ПМАК}}=0,14$ (1); 0,4 (2); 1,0 (3) или при одном $\alpha_{\text{ПМАК}}=0,4$, но при различных $n=0,1$ (4), 1 (2), 2 (5), 5 (6)

Рис. 4. Влияние условий формирования (относительного содержания n белка в растворе) комплекса белок – ПМАК на его стабильность в водно-солевых растворах при значениях $i=0,2$ (1) или 0,4 (2)

комплекса белок – ПМАК. Уменьшение величины $1/P$ люминесценции ПВП* в растворе ПМАК указывает на образование интерполимерного комплекса [8]. Из приведенных данных следует, что при $n=1$ имеются свободные участки ПМАК, а при $n=5$ все цепи ПМАК заполнены белком. Доля участков ПМАК, заполненных белком, $\theta_{\text{ПМАК}}$ определяется с помощью предварительно полученной калибровочной зависимости поляризации люминесценции ПВП* от содержания ПМАК в растворе. Эти данные можно также получить, используя соотношение

$$1/\tau = \theta/120 + (1-\theta)/11,$$

в котором θ – доля ПМАК, заполненой белком; 11 и 120 нс – времена релаксации свободной и заполненой белком ПМАК соответственно; τ – время релаксации исследуемой системы белок – ПМАК*.

С помощью разработанных методов определен состав комплекса белок – полимер (при $\alpha_{\text{ПМАК}}=0,4$ и концентрации белка 0,5 мг/мл) при различном исходном содержании белка в растворе, т. е. при различном соотношении белок – полимер n (рис. 2). Изменение значений τ от 11 нс для свободной ПМАК до 120 нс для ПМАК, заполненой белком, указывает на множественность контактов полимерных цепей ПМАК с белковыми глобулами. Интересно отметить, что длина участка ПМАК, приходящегося на одну белковую глобулу (например, при $n=3$), примерно соответствует длине окружности белковой глобулы. Возможно, полимерная цепь ПМАК обвивает по окружности каждую из белковых глобул. Наличие свободных

Значения $1/P$ люминесценции ПВП* в водном растворе при содержании ПВП 0,5 мг/мл в отсутствие и в присутствии отдельных компонентов системы белок – ПМАК

Система	Мольное соотношение компонентов	Значение $1/P$	Система	Мольное соотношение компонентов	Значение $1/P$
ПВП *		18	ПВП * : белок : ПМАК	170 : 1 : 170	8,5
ПВП * : ПМАК	1 : 1	6	ПВП * : белок : ПМАК	170 : 5 : 170	18
ПВП * : ПМАК	1 : 0,2	8,5	Белок *		21
ПВП * : белок	170 : 5	18	Белок * : ПМАК	3 : 170	12
			ПВП : белок * : ПМАК	340 : 3 : 170	12

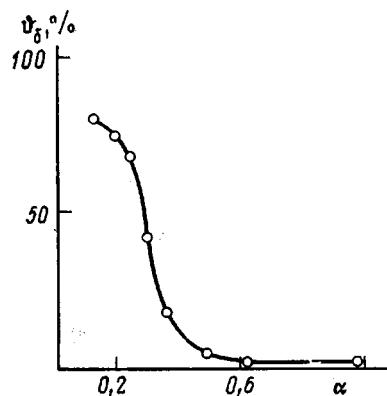


Рис. 5

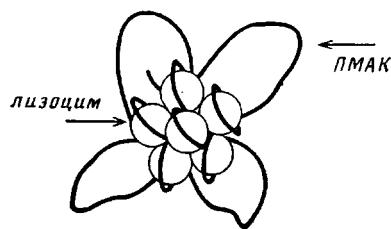


Рис. 6

Рис. 5. Влияние степени ионизации карбоксильных групп ПМАК на стабильность комплекса белок – ПМАК, сформированного при $n=1$ в водно-солевом растворе при ионной силе $i=1$

Рис. 6. Схема строения структурированных участков поликомплекса лизоцим – ПМАК в водном растворе при относительном содержании белка в растворе $n=1$ ($\alpha_{\text{ПМАК}}=0,4$)

и заполненных белком участков ПМАК (при $n < 3$) означает, что распределение белка по участкам полимерных цепей ПМАК осуществляется неравномерно, по принципу «все или ничего».

До сих пор обсуждалось взаимодействие белок – ПМАК при степени ионизации карбоксильных групп ПМАК $\alpha=0,4$. При более низких $\alpha < 0,3$ в макромолекулах ПМАК имеются структурированные участки, но полученные данные показывают, что их наличие не оказывается на доле белка, связанного ПМАК. Доля белка, связанного ПМАК в воде, не зависит от степени ионизации карбоксильных групп ПМАК и при более высоких значениях α .

Исследование стабильности комплексов белок – ПМАК в водно-солевых растворах показало, что доля белка, связанного ПМАК, уменьшается с увеличением α и ионной силы раствора (рис. 3). Это значит, что кроме электростатических взаимодействий заряженных групп белка и ПМАК существенную роль в стабилизации комплекса лизоцим – ПМАК играют водородные связи белка с неионизованными карбоксильными группами ПМАК.

При изучении стабильности комплексов белок – ПМАК в водно-солевых растворах получен еще один важный результат, показывающий, что стабильность комплекса зависит от условий его формирования, от исходного соотношения белок – полимер в растворе, с которым связано соотношение белок – полимер в комплексе. Данные рис. 3 и 4 показывают, что лишь при определенном соотношении белок – полимер $n=1$ (одна молекула белка на 170 звеньев ПМАК) и в весьма узком интервале его изменения комплекс белок – ПМАК имеет высокую стабильность. При уменьшении или увеличении содержания белка в растворе комплекс разрушается даже при низкой ионной силе (рис. 3).

Увеличение стабильности комплекса в водно-солевых растворах при определенном отношении белок – полимер ($n=1$) связано с появлением дополнительного стабилизующего фактора, о чем свидетельствует кооперативный характер разрушения комплекса белок – ПМАК ($n=1$) при ионизации карбоксильных групп ПМАК в водно-солевых растворах при высокой ионной силе (рис. 5). Таким фактором могут быть гидрофобные взаимодействия участков ПМАК, заполненных белком. Это взаимодействие приводит к компактному расположению участков ПМАК и связанных с ними белковых глобул (рис. 6) и проявляется в усилении миграции энергии электронного возбуждения люминесцирующих групп белка, вызывающем изменение поляризации люминесценции $\Delta(1/P_0^*)$ (рис. 2).

Зависимость величины $\Delta(1/P_0^*)$ от отношения белок – полимер, как и изменение стабильности комплекса в водно-солевом растворе, имеет точку перегиба при $n=1$, когда достигается наибольшая стабильность. Максимум стабильности комплекса белок – ПМАК в водно-солевых растворах при определенном n связан с тем, что при низком содержании белка мало участков ПМАК, заполненных белком, слипание которых повышает стабильность комплекса. При увеличении содержания белка ($1 < n < 3$) уменьшается доля свободных участков ПМАК с высокой конформационной лабильностью, что затрудняет подстройку и слипание участков ПМАК, заполненных белком. При $n=1$ доля свободных участков составляет 66%, тогда как при $n=3$ ($\alpha=0,4$) практически все цепи ПМАК заняты белком. Дальнейшее увеличение содержания белка в растворе ПМАК ($n>3$) приводит к тому, что часть молекул белка не включается в компактную структуру, а располагается на поверхности надмолекулярного образования. С этим связано, например, значительное уменьшение стабильности комплекса при $n=5$ (рис. 3, 4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Кабанов В. А., Мустафаев М. И. // Высокомолек. соед. А. 1981. Т. 23. № 2. С. 255.
2. Паутов В. Д., Кузнецова Н. П., Мишаева Р. Н., Ануфриева Е. В. // Высокомолек. соед. А. 1983. Т. 25. № 8. С. 1599.
3. Ануфриева Е. В. // Современные физические методы исследования полимеров. М., 1982. С. 77.
4. Anufrieva E. V. // Pure and Appl. Chem. 1982. V. 54. № 2. P. 533.
5. Anufrieva E. V., Gotlib Y. Y. // Advances Polymer Sci. 1981. V. 40. P. 1.
6. Krakovskaya M. G., Lushchik V. B., Sycheva E. A., Anufrieva E. V. // Высокомолек. соед. Б. 1986. Т. 28. № 4. С. 289.
7. Krakovyak M. G., Anufrieva E. V., Lushchik V. B., Shelekhov N. S., Skorokhodov S. S. // J. Macromolec. Sci. Chem. 1978. V. 12(6). P. 789.
8. Ануфриева Е. В., Паутов В. Д., Паписов И. М., Кабанов В. А. // Докл. АН СССР. 1977. Т. 232. № 5. С. 1096.

Институт высокомолекулярных
соединений АН СССР

Поступила в редакцию
5.VIII.1985

INTERACTION OF PROTEIN MOLECULES WITH LINEAR POLYELECTROLYTE IN SOLUTION

Anufrieva Ye. V., Pautov V. D., Kuznetsova N. P., Lushchik V. B.,
Krakovskaya M. G.

Summary

The changes of dynamic characteristics of protein globules (lisocime) and polyelectrolyte chains (polymethacrylic acid) in the process of complex formation in water and water-salt solutions have been analysed using polarized luminescence method. The irregular character of protein molecules distribution between polyelectrolyte chains is shown: some parts of polymethacrylic acid are filled with compactly disposed protein, some parts are free. The conditions of formation and structural features promoting an increase of stability of the protein-polyelectrolyte complex are found.