

АНАЛИЗ КООПЕРАТИВНОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ БЕЛКОВ С КАРБОКСИЛЬНЫМ МАКРОСЕТЧАТЫМ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОМ

Кузнецова Н. П., Мишаева Р. И., Самсонов Г. В.

Количественный анализ закономерностей связывания белков с карбоксильными сетчатыми полиэлектролитами (КСПЭ) представляет сложную задачу вследствие полифункциональности исходных компонентов. К тому же в этих системах может меняться степень ионизации КСПЭ, общий заряд белковой макромолекулы, а также гидратация компонентов системы. Все факторы проявляются в необычных изотермах сорбции, выражающихся зависимость количества связанного белка от его равновесной концентрации в растворе.

Настоящая работа посвящена количественному анализу изотерм связывания ряда белков с микродисперсными формами макросетчатого полиэлектролита, являющегося сополимером метакриловой кислоты и 2,5 мол. % этилендиметакриламида (КМДМ). Использовали белки с различными изоэлектрическими точками (*pI*): человеческий сывороточный альбумин (СА) ($M=6,8 \cdot 10^6$, *pI* 4,7), человеческий гемоглобин (ГГ) ($M=6,5 \cdot 10^6$, *pI* 6,7), яичный лизоцим (ЛЗ) ($M=1,4 \cdot 10^6$, *pI* 10,5).

Одним из важнейших факторов, влияющих на процесс связывания белков с КСПЭ, является степень ионизации сетчатого полиэлектролита, которая определяет конформацию участков цепей, заключенных между химическими и физическими узлами, и отражает различные уровни их внутримолекулярной подвижности [1–3]. В связи с этим исследовали изотермы связывания белков с КМДМ при различных степенях ионизации КСПЭ (рис. 1).

Особенность поглощения белков неионизованной формой ($\alpha=0$) КМДМ состоит в S-образной зависимости количества связанного белка от его равновесной концентрации в растворе. Такая форма зависимости свидетельствует о кооперативности процесса. Возможно, присоединение первых белковых молекул происходит в результате образования водородных связей с неионизованными группами КСПЭ. Затем электростатическое поле связанного белка за счет полифункционального взаимодействия воздействует на матрицу КСПЭ, приводя к структурным изменениям в цепях и к появлению дополнительных активных центров связывания. S-образные кривые прежде всего означают, что взаимодействие первой молекулы белка с КСПЭ повышает специфичность присоединения последующих молекул.

Для количественного описания кооперативного процесса взаимодействия в системе белок – низкомолекулярный лиганд используют уравнение Хилла, выражающее зависимость степени насыщения макромолекулы лигандом от равновесной концентрации последнего в растворе [4, 5]

$$\frac{y}{1-y} = KC_p^n,$$

где y – доля насыщения макромолекулы лигандом, описывающая все процессы связывания и равная отношению количества связанного лиганда к количеству центров связывания; C_p – концентрация лиганда в растворе (равновесная); K – константа равновесия; n – показатель степени, характеризующий меру кооперативности процесса связывания. Его величина соответствует гипотетическому количеству лигандных молекул, необходимых, чтобы связывание было полностью кооперативным.

Если $n > 1$, изотерма имеет S-образный характер и отражает кооперативный процесс, в котором связывание всякой последующей молекулы

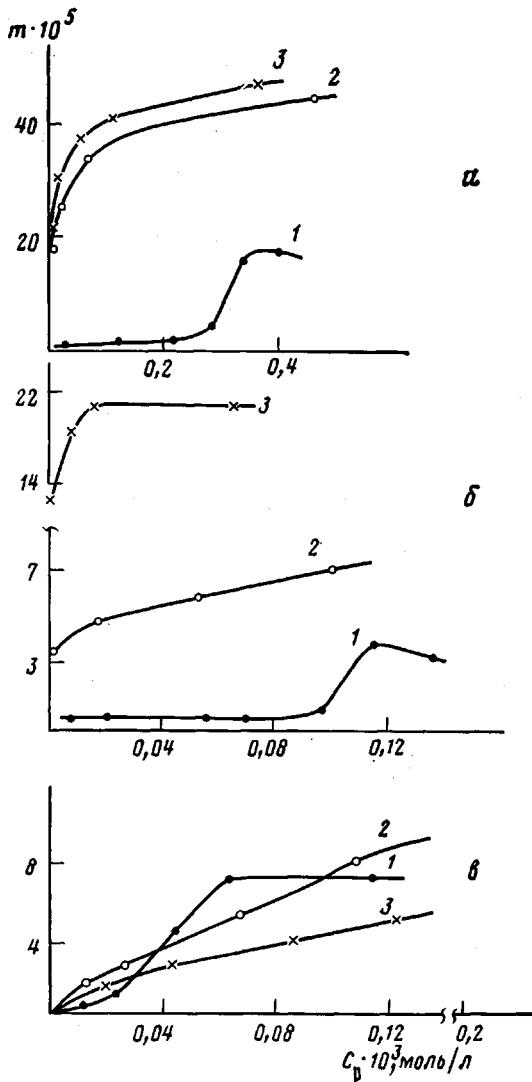


Рис. 1. Изотермы связывания белков ЛЗ (а), ГГ (б) и СА (в) с КМДМ при $\alpha=0$ (1); 0,13 (2) и 0,4 (3). m — количество белка в молях, связанного 1 г КСПЭ. Фракция КМДМ с размером частиц 1–5 мкм

белка с КСПЭ предпочтительнее в присутствии уже связанной. Если все центры идентичны и независимы, то $n=1$, кривая становится гиперболической и описывается изотермой Лэнгмиора.

Параметр n , называемый константой Хилла, характеризует крутизну подъема кооперативной кривой. Уравнение Хилла логарифмированием преобразуется в линейную форму

$$\lg \frac{y}{1-y} = \lg K + n \lg C_p$$

Из зависимости $\lg \frac{y}{1-y}$ от $\lg C_p$ (в координатах Хилла) величина n определяется графически (как тангенс угла наклона прямой) в диапазоне степеней насыщения $y=0,2-0,8$, поскольку в действительности S-образная кривая никогда не бывает полностью кооперативной, и максимально кооперативное взаимодействие возможно только вблизи $y \sim 0,5$ для сим-

метричной кооперативной кривой. Крайние же (начальный и конечный) участки кривой соответствуют связыванию первой и последней лигандных молекул со своей константой и величиной $n \sim 1$.

Аналогичная форма кривых, описывающих взаимодействия в системах белок – низкомолекулярный лиганд и КСПЭ – белок, позволяет использовать уравнение Хилла не только для анализа систем типа I, но и для количественного изучения систем типа II. При этом можно предложить сопоставимые молекулярные модели для этих систем в виде кооперативных кластеров. В применении к процессам связывания макромолекул белка с КСПЭ следует степень насыщения КСПЭ белком-лигандом заменить отношением количества связанных белка в данных условиях (при данной концентрации в растворе) к предельному, т. е. $y = m/m_{\text{пп}}$; тогда уравнение Хилла примет вид

$$\frac{m}{m_{\text{пп}} - m} = KC_p^n \quad \text{или} \quad m/m_{\text{пп}} = \frac{KC_p^n}{1 + KC_p^n}$$

Кооперативные кривые связывания белков неионизованным макросетчатым полизэлектролитом КМДМ, как видно из рис. 1, не симметричны.

Рис. 2. Связывание белков ЛЗ (1), ГГ (2) и СА (3) неионизованной формой КМДМ в координатах Хилла

Рис. 3. Связывание белков ГГ (1, 2), ЛЗ (3) и СА (4, 5) с КМДМ в координатах Хилла при степенях ионизации сетчатого полизэлектролита $\alpha = 0,13$ (1, 4) и $0,4$ (2, 3, 5)

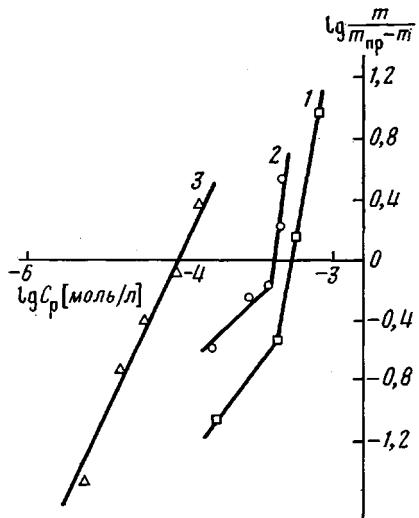


Рис. 2

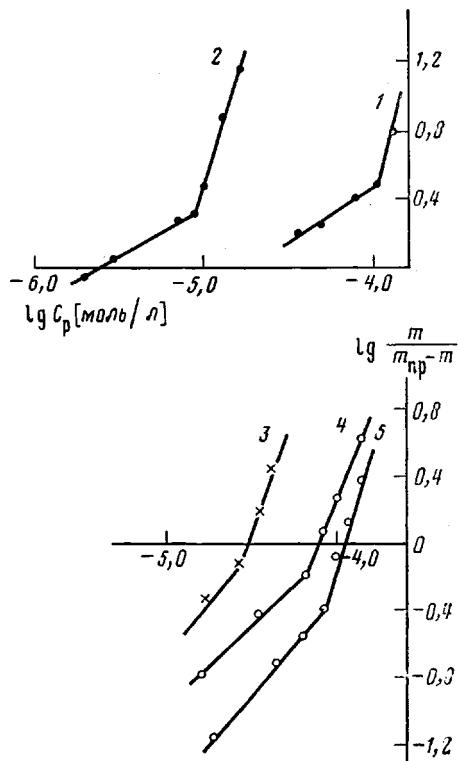


Рис. 3

Это особенно выявляется при выражении результатов в координатах Хилла, т. е. в координатах двойной логарифмической зависимости (рис. 2). Для связывания ГГ и ЛЗ отчетливо наблюдаются два участка прямой с разными наклонами (n_1 и n_{II}). Следует заметить, что для точной оценки при очень низких равновесных концентрациях белков недостаточно экспериментальных данных, но наклон n_1 важен прежде всего тем, что иллюстрирует наличие двух процессов, некооперативного (I) и кооперативного (II), и дает ту долю насыщения КСПЭ белком ($m/m_{\text{пп}}$), при которой процесс приобретает кооперативный характер (I-II): $m/m_{\text{пп}}$ для системы ЛЗ – КМДМ равно 0,22, а для системы ГГ – КМДМ 0,41. Первый участок

имеет величину n_1 , близкую к единице. В кооперативном процессе параметр n_{II} заметно отличен от единицы и варьирует от 2,3 для СА до 8 для ГГ. Результаты исследования кооперативных изотерм на неионизованной форме КМДМ по результатам рис. 2 представлены в таблице.

Основные параметры кооперативности изотерм белок – КМДМ при различных степенях ионизации сетчатого полизелектролита

Система	р _I белка	α КМДМ	Стадия n_I		Стадия n_{II}
			n_I	$m/m_{\text{пр}}$	
ЛЗ – КМДМ	10,5	0,0	0,7	0,22	4,0
		0,4	1,5	0,44	2,5
ГГ – КМДМ	6,8	0,0	1,3	0,41	8,0
		0,13	0,8	0,62	3,2
		0,4	0,7	0,52	3,0
СА – КМДМ	4,7	0,0	—	—	2,3
		0,13	1,0	0,33	3,1
		0,4	1,2	0,15	3,5

При малом заполнении КСПЭ белком форма кривых связывания в значительной мере определяется взаимодействием белок – КСПЭ. При высоких степенях заполнения существенную роль могут играть взаимодействия между сорбированными макромолекулами белка. Поэтому следует оценивать разные участки кривой, поскольку они отражают различные процессы при взаимодействии, приводящие к различным типам связывания.

При взаимодействии белков с неионизированной формой КМДМ кооперативность проявляется в симоидном характере изотерм; в случае связывания белков частично ионизированной формой КМДМ ($\alpha=0,13$ и 0,4) изотерма гиперболическая и отражает только участок, близкий к насыщению, так как появление равновесной концентрации белка в растворе наблюдается уже при достижении значительной степени насыщения КСПЭ белком (рис. 1). Интересно оценить и для этого вида изотерм изменение параметров связывания в координатах Хилла (рис. 3, таблица). Практически для всех систем, как и в случае явно выраженной кооперативности ($\alpha=0$), наблюдаются две стадии процесса: некооперативная с $n_I \sim 1$ и кооперативная с n_{II} от 2,5 до 3,5 при увеличении степени заполнения КМДМ белком. На основании анализа изотерм в координатах Хилла представляется возможным выявить кооперативный характер в высокоизбирательных системах, имеющих гиперболическую форму изотерм.

Используемый слабоспиртный сетчатый полизелектролит обладает достаточно гибкими цепями, способными подстраиваться под макромолекулу белка [6]. При взаимодействии КСПЭ с белком в роли единичного центра связывания выступает совокупность функциональных групп обоих компонентов. Для изучаемых систем параметр n можно трактовать как количество центров связывания для белковых макромолекул, действующих в виде кооперативной единицы и фиксированных вблизи одного активного центра КСПЭ, т. е. как модельное описание белковых кластеров на матрице КСПЭ, в которых проявляется кооперативность взаимодействия.

Величина n связана с концентрацией белковых макромолекул, находящихся в одной кооперативной единице. Формирование ассоциатов ЛЗ на матрице КМДМ показано методом поляризованной люминесценции [7]. Предположение об ассоциации ГГ в порах карбоксильного катионита Биокарб было выдвинуто в работе [8] на основании исследования струк-

туры комплекса КСПЭ – ГГ методом электронной микроскопии. При насыщении практически вся поверхность пор заполнена ассоциатами белка, представляющими упорядоченные звездчатые образования. На межбелковые взаимодействия при адсорбционной иммобилизации ферментов указывалось в работах [9, 10].

Ассоциацией белковых макромолекул можно объяснить достижение высокой емкости сорбции белков на микродисперсных формах КСПЭ до 20 г белка на 1 г сетчатого полиэлектролита [11]. Явление ассоциации белков на матрице полиэлектролита может служить моделью клеточных организаций.

Таким образом, используя в качестве теста кооперативного поведения системы наклон n зависимости Хилла, в каждом случае можно дать количественное заключение о том, кооперативно протекает та или иная стадия процесса или нет, и оценочно определить концентрацию лигандов в одной кооперативной единице.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузнецова Н. П., Мишаева Р. Н., Гудкин Л. Р., Самсонов Г. В. Высокомолек. соед. А, 1983, т. 25, № 12, с. 2580.
2. Кузнецова Н. П., Мишаева Р. Н., Гудкин Л. Р., Самсонов Г. В. Высокомолек. соед. Б, 1983, т. 25, № 10, с. 750.
3. Шатаева Л. К., Кузнецова Н. Н., Елькин Г. Э. В кн.: Карбоксильные катиониты в биологии/Под ред. Самсонова Г. В. Л.: Наука, 1979, с. 93, 213.
4. Laurence D. J. R. In: Physical Methods in Makromolecular Chemistry/Ed. by Carroll B. N. Y., 1972, v. 2, p. 91.
5. Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В., Мевх А. Т. В кн.: Итоги науки и техники. Сер. биоорганической химии. М.: ВИНИТИ, 1985, т. 3, с. 1.
6. Ануфриева Е. В., Кузнецова Н. П., Краковяк М. Г., Мишаева Р. Н., Паутов В. Д., Семисотнов Г. В., Шевелева Т. В. Высокомолек. соед. А, 1977, т. 19, № 1, с. 102.
7. Паутов В. Д., Кузнецова Н. П., Мишаева Р. Н., Ануфриева Е. В. Высокомолек. соед. А, 1983, т. 25, № 8, с. 1599.
8. Чернова И. А., Погодина Т. Е., Шатаева Л. К., Самсонов Г. В. Высокомолек. соед. А, 1980, т. 22, № 11, с. 2403.
9. Полторак О. М., Чухрай Е. С., Пряхин А. Н. Журн. физ. химии, 1978, т. 52, № 5, с. 1089.
10. Камышный А. А. Журн. физ. химии, 1981, т. 55, № 3, с. 562.
11. Наумова Л. В., Воробьева В. Я., Самсонов Г. В. Журн. прикл. химии, 1980, т. 53, № 4, с. 764.

Институт высокомолекулярных
соединений АН СССР

Поступила в редакцию
13.I.1986

УДК 541(64+183.12):546

ВТОРИЧНАЯ ПОРИСТОСТЬ И СОСТОЯНИЕ ВОДЫ В ГЕТЕРОСЕТЧАТЫХ КАРБОКСИЛЬНЫХ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТАХ

Писарев О. А., Добродумов А. В., Муравьева Т. Д.,
Денисов В. М., Кольцов А. И., Самсонов Г. В.

Сложность процессов ионного обмена в водных растворах на синтетических сетчатых полиэлектролитах в значительной степени связана с особыми свойствами воды как растворителя. Структура сорбированного полимерными электролитами растворителя исследована в ряде работ, где показано, что состояние «внутренней» воды в ионите близко к состоянию воды в растворах простых электролитов, но существенно осложнено присутствием углеводородной матрицы с малоподвижными функциональными группами [1–3]. Однако в литературе отсутствуют сведения о сравнительном изучении набухания и состояния воды в карбоксильных сетча-