

# ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

*Краткие сообщения*

Том (Б) XXXI

1989

№ 10

УДК 541.64 : 536.7

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

## ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КООПЕРАТИВНОГО СВЯЗЫВАНИЯ БЕЛКОВ КАРБОКСИЛЬНЫМИ СЕТЧАТЫМИ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТАМИ

Проведен термодинамический анализ кооперативного процесса связывания белков карбоксильными сетчатыми полиэлектролитами на основе теории связанных функций Уаймена. Показано, что происходит компенсация энタルпийной и энтропийной составляющих термодинамического потенциала Гиббса для взаимодействия белка с карбоксильными сетчатыми полиэлектролитами на основе акриловой и метакриловой кислот при разных степенях ионизации.

Кооперативный характер связывания широко распространен при взаимодействии низкомолекулярных лигандов с биологическими макромолекулами. Он наблюдается при образовании сложных надмолекулярных структур и субклеточных систем, при взаимодействии белковых субъединиц, а также в эффекте аллостерического регулирования функции биополимеров.

Способы определения равновесных констант связывания для кооперативных систем весьма сложны, поскольку требуют учитывать средство неидентичных центров связывания и их взаимное влияние [1, 2]. При этом изменение термодинамического потенциала Гиббса на один связывающий центр должно учитывать сумму констант равновесия каждой ступени кооперативного процесса. Способ определения интегральных величин изменения термодинамического потенциала Гиббса в кооперативных процессах был предложен и теоретически обоснован Уайменом в развитой им теории связанных функций [3–5]. В данной работе эту теорию, устанавливающую общий термодинамический смысл кооперативного поведения системы, использовали для термодинамического анализа кооперативного взаимодействия белков (лизоцима, гемоглобина, сывороточного альбумина) с карбоксильными сетчатыми полиэлектролитами (ПЭЛ)<sup>1</sup> – сополимерами акриловой (КАДМ) или метакриловой кислот (КМДМ) с N,N'- этиленди-метакриламидом (2,5 мол. %).

Сигмоидная форма кооперативных кривых связывания (рис. 1) позволяет использовать для количественного анализа системы белок – карбоксильный сетчатый ПЭЛ уравнение Хилла [6]

$$y/(1-y) = KC_p^n,$$

где  $y$  – степень насыщения ПЭЛ белком (от 0 до 1);  $C_p$  – равновесная концентрация белка в растворе;  $n$  – коэффициент Хилла, отражающий меру кооперативности взаимодействующей системы.

<sup>1</sup> Выражаем благодарность К. М. Рожецкой за синтез карбоксильных сетчатых полиэлектролитов.

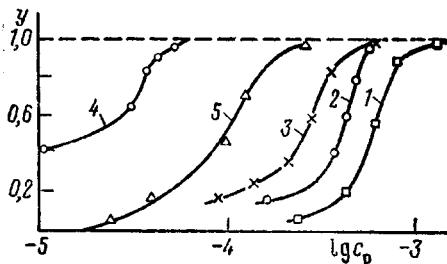


Рис. 1

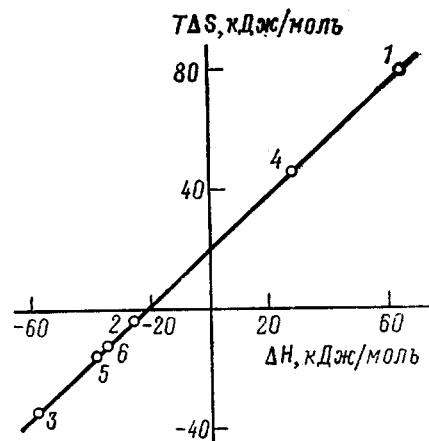


Рис. 2

Рис. 1. Связывание белков лизоцима (1), гемоглобина (2–4) и сывороточного альбумина (5) неионизованной формой ( $\alpha=0$ ) сетчатых полиэлектролитов. 1, 2, 5 – КМДМ, 3 – КАДМ, 4 – КМДМ, супензионная полимеризация

Рис. 2. Компенсационная зависимость термодинамических функций  $\Delta H$  и  $T\Delta S$  связывания гемоглобина с серией ПЭЛ. 1–3 – КМДМ,  $\alpha=0$  (1); 0,13 (2) и 0,45 (3); 4, 5 – КАДМ,  $\alpha=0$  (4) и 0,20 (5); 6 – КМДМ, супензионная полимеризация,  $\alpha=0$

Для кооперативных систем, согласно теории связанных функций Уаймена, изменение термодинамического потенциала Гиббса при взаимодействии лиганда с одним центром связывания на носителе является функцией занятости ближайших соседних центров, а вероятность единичного центра быть занятым лигандом рассматривается зависимой от активности лиганда, требуемой для создания и поддержания заданной степени насыщения носителя лигандом. Поэтому важной характеристикой кооперативного процесса является равновесная концентрация лиганда, определяемая в условиях максимальной кооперативности связывания [7]. При этом вводится понятие средней лигандной активности  $C_m$ , которую можно оценить для симметричной равновесной кривой как среднее значение равновесной концентрации лиганда при полунасыщении носителя лигандом. Величина  $\lg C_m$  может быть определена также графически как середина прямолинейного участка двойной логарифмической зависимости Хилла  $\lg(y/(1-y))$  против  $\lg C_p$ . Средняя лигандная активность, являясь интегральной величиной кооперативного процесса диссоциации комплекса лиганд – носитель, дает меру изменения термодинамического потенциала Гиббса, меру изменения стабильности кооперативного комплекса

$$\Delta g = RT \ln C_m$$

В табл. 1 представлены величины  $\lg C_m$  и  $\Delta g$ , полученные для ряда систем из графического построения. Величины изменения энталпии системы (энергетическая составляющая) для взаимодействия гемоглобина с ПЭЛ были определены методом микрокалориметрии [8], что позволило также рассчитать энтропийные составляющие термодинамического потенциала (табл. 2).

Следует отметить, что выгодное для протекания процесса изменение величины  $\Delta g$  исследуемых систем связано с очень большими вариациями в величинах  $\Delta H$  и  $T\Delta S$  поглощения гемоглобина сетчатыми сополимерами при изменении их степени ионизации. Как следует из табл. 2, определяющий вклад энтропии в процесс связывания отчетливо проявляется в тех случаях, когда в ПЭЛ имеются структурно-упорядоченные участки цепей ПЭЛ ( $\alpha=0$ ). Можно полагать, что энтропийный фактор взаимодействия ПЭЛ с белком связан с нарушением локальной внутренней струк-

Таблица 1

**Величины логарифма средней лигандной активности и изменения термодинамического потенциала Гиббса для ряда исследованных систем**

Система	$\alpha$	$\lg C_m$	$\Delta g$ , кДж/моль
Сывороточный альбумин — КМДМ	0,00	-4,00	-22,8
	0,14	-3,90	-22,2
	0,40	-3,90	-22,2
Гемоглобин — КМДМ	0,00	-3,35	-19,0
	0,14	-4,30	-24,5
	0,40	-4,90	-27,9
Гемоглобин — КМДМ *	0,00	-4,40	-25,1
Гемоглобин — КАДМ	0,00	-3,50	-19,9
Лизоцим — КМДМ	0,00	-3,26	-18,6
	0,14	-4,58	-26,0
	0,40	-4,32	-24,6

\* Суспензионная полимеризация.

Таблица 2

**Термодинамические функции взаимодействия гемоглобина с ПЭЛ**

Система	$\alpha$	$\Delta g$ , кДж/моль	$\Delta H$ , кДж/моль	$T\Delta S$ , кДж/моль
Гемоглобин — КМДМ	0,00	-19,0	+62,3	+81,3
	0,30	-25,4	-28,1	-2,7
	0,45	-28,7	-62,0	-33,3
Гемоглобин — КАДМ	0,00	-19,9	+27,3	+47,2
	0,20	-29,0	-41,1	-12,1
Гемоглобин — КМДМ *	0,00	-25,1	-38,2	-13,1

\* Суспензионная полимеризация.

туры цепей в результате полифункционального взаимодействия с гемоглобином. При этом процесс сопровождается изменением структурной организации воды (разрушением гидрофобных взаимодействий в цепях ПМАК), а также разрывом Н-связей, в цепях как ПМАК, так и ПАК, что благоприятствует увеличению количества микросостояний системы.

В результате электрохимической гетерогенности карбоксильных групп ПЭЛ, полученного суспензионной полимеризацией, процесс связывания гемоглобина с ПЭЛ даже при  $\alpha=0$  выгоден энергетически.

Соотношение термодинамических функций избирательного связывания в серии систем с одним общим компонентом гемоглобином и разными ПЭЛ при различных степенях ионизации ПЭЛ выражается в эффекте энталпийно-энтропийной компенсации. На рис. 2 представлена линейная компенсационная зависимость термодинамических функций  $\Delta H$  и  $T\Delta S$ . Точки, относящиеся к разным степеням ионизации карбоксильных групп одного сополимера или ПЭЛ разной природы (АК и МАК), располагаются на одной прямой. Это может свидетельствовать об одинаковой природе взаимодействия рассматриваемых сополимеров с гемоглобином при вариации условий связывания: на рисунке четко обозначены области энталпийного или энтропийного управления процессом связывания. Эффект компенсации энталпийной и энтропийной составляющих является наиболее распространенной характеристикой многих реакций, происходящих в воде, и для систем с кооперативным изменением структуры компонентов [9].

Из данных, представленных в координатах Хилла, можно получить количественную оценку кажущейся константы равновесия и количество

Таблица 3

## Параметры кооперативных взаимодействий в системе белок — ПЭЛ

Система	$\alpha$	$n$	$\xi_2 - \xi_1$	$\Delta g_n$ , кДж/моль
Сывороточный альбумин — КМДМ	0,00	2,3	0,62	2,2
	0,13	3,1	0,34	1,2
	0,40	3,5	0,34	1,2
Гемоглобин — КАДМ	0,00	6,6	0,52	1,8
Гемоглобин — КМДМ	0,00	8,0	0,42	1,5
Гемоглобин — КМДМ *	0,00	8,0	0,74	2,6
Лизоцим — КМДМ	0,00	4,0	0,86	3,0

\* Суспензионная полимеризация.

центров  $n$ , действующих как кооперативная единица. Следует помнить, что в сложной системе, где лигандом является белковая макромолекула, центр связывания на ПЭЛ представляется совокупностью функциональных групп, способных связывать белок.

Параметр  $n$  тесно связан с изменением термодинамического потенциала Гиббса, выражающего взаимодействие центров связывания в кооперативной единице

$$n = \frac{d \ln y / (1-y)}{d \ln C_p} = \frac{1}{y(1-y)} \frac{dy}{d \ln C_p}$$

Если центры идентичны и независимы ( $n=1$ ), то парциальные величины изменения термодинамического потенциала Гиббса при связывании первого и второго лигандов одинаковы. Если  $n \neq 1$ , то разность этих величин представляет энергию, стабилизирующую систему и приходящуюся на один центр. Принимая ее положительной величиной, Уаймен при  $n > 1$  представляет суммарный термодинамический потенциал кооперативного процесса, обусловленного кооперативным взаимодействием центров связывания следующим образом:

$$\Delta g_n = \int_{y=0}^1 \left( 1 - \frac{1}{n} \right) \frac{dy}{y(1-y)} = RT \int_{C_p=0}^{\infty} (n-1) d \ln C_p$$

Интеграл в уравнении определяется графически путем дополнительных построений новых осей  $\xi - \xi$  под углом  $45^\circ$  к осям зависимости Хилла ( $\lg y / (1-y) - \lg C_p$ ) [3]. Тогда кооперативное взаимодействие центров связывания в новых координатах будет выражаться разностью координат точек, соответствующих началу и концу кооперативного процесса ( $\xi_2 - \xi_1$ ). Определив ( $\xi_2 - \xi_1$ ), можно рассчитать изменение термодинамического потенциала Гиббса, характеризующего взаимодействие центров связывания по формуле

$$\Delta g_n = RT \bar{V}2 (\xi_2 - \xi_1)$$

Значения  $\Delta g_n$  для кооперативных систем, отражающих взаимодействие белок — ПЭЛ, представлены в табл. 3. Величины  $\Delta g_n$  небольшие, для кооперативно взаимодействующих центров в ПЭЛ составляют 8–15% от величины изменения общего термодинамического потенциала связывания и находятся практически в пределах погрешности определения больших интегральных величин  $\Delta g$ , представленных в табл. 2. Незначительный вклад  $\Delta g_n$ , обусловленный кооперативным взаимодействием центров связывания, в изменение общего термодинамического потенциала  $\Delta g$  может или свидетельствовать о малом взаимном влиянии центров связывания, или определяться компенсацией изменения его энталпийной и энтропийной составляющих.

Таким образом, впервые на основании теории связанных функций Уаймена определены интегральные изменения термодинамического потенциала Гиббса для кооперативного взаимодействия белок — ПЭЛ и изменение этой функции с учетом кооперативного взаимодействия центров связывания ПЭЛ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ramanath B., Schmitz K. S. // Biopolymers. 1978. V. 17. № 9. P. 2171.
2. Ландай М. А. Молекулярные механизмы действия физиологически активных соединений. М., 1981. С. 42.
3. Wyman J. Jr. // Advances Protein. Chem. 1964. V. 19. P. 224.
4. Tanford C., Reynolds J. A., Johnnon E. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 14. P. 4688.
5. Волькенштейн М. В. Биофизика. 2-е изд. М., 1988. С. 214.
6. Кузнецова Н. П., Мишаева Р. Н., Самсонов Г. В. // Высокомолек. соед. Б. 1987. Т. 28. № 1. С. 10.
7. Neville M. C., Kelman R. B., Briese F. W. // J. Theor. Biol. 1972. V. 35. P. 129.
8. Писарев О. А., Кузнецова Н. П., Мишаева Р. Н., Самсонов Г. В. // Высокомолек. соед. Б. 1985. Т. 27. № 4. С. 261.
9. Ламри Р., Билтонен Р. // Структура и стабильность биологических макромолекул. М., 1973. С. 7.

Институт высокомолекулярных  
соединений АН СССР

Поступила в редакцию  
04.10.88

УДК 541.64 : 542.954

Е. Ш. Мирзоева, Л. М. Бронштейн, П. М. Валецкий,  
А. Л. Блюменфельд, В. В. Казанцева, С. В. Виноградова,  
**В. В. Коршак**

#### НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА РОДИЙСОДЕРЖАЩИХ ПОЛИМЕРОВ

Изучены термические, релаксационные и физико-химические свойства полимеров, содержащих олефиновые комплексы хлорида, карбонилхлорида и карбонила родия. Методом протонной спир-решеточной релаксации охарактеризовано изменение упаковки полимерных цепей полибутидиена и поли(стирол-бутидиенового) блок-сополимера в результате введения в них комплексов родия. Установлены некоторые закономерности изменения деформационно-прочностных характеристик пленок родийсодержащих полимеров от содержания в них соответствующих комплексов. Температура начала разложения полимерных комплексов с карбонилом, карбонилхлоридом и хлоридом родия равны 120, 130 и 230° соответственно.

Металлокомплексные полимеры платинового ряда, в том числе и родийсодержащие, привлекают внимание вследствие их катализитической активности в органических реакциях. Цель настоящей работы — изучение термических, релаксационных и физико-химических свойств полимеров, содержащих олефиновые комплексы хлорида родия (ХР), карбонилхлорида родия (КХР) и карбонила родия (КР), где в качестве матрицы использованы полибутидиен (ПБ) и поли(стирол-бутидиеновый) блок-сополимер (ДСТ-30) [1, 2]. Изучение этих свойств представлялось необходимым, так как ранее была обнаружена катализитическая активность указанных родийсодержащих полимеров в реакциях гидрирования.

Известно [1], что в случае реакции ПБ или ДСТ-30 с КХР ( $[\text{RhCl}(\text{CO})_2]_2$ ) или КР ( $[\text{Rh}_4(\text{CO})_{12}]$ ) в бензоле формируются в основном внутримолекулярные комплексы диолефинового типа, а в результате реакции с ХР ( $\text{RhCl}_3$ ) в среде бензол : этанол = 9 : 1 образуются тетраолефиновые комплексы с частными межмолекулярными связями.