

УДК 541(41+49):539.199

КОНФОРМАЦИОННЫЕ И ФАЗОВЫЕ ПЕРЕХОДЫ В КОМПЛЕКСАХ ЛИЗОЦИМА С ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫМ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОМ¹

© 2006 г. Т. В. Бурова, Н. В. Гринберг, В. Я. Гринберг

Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук

119991 Москва, ул. Косыгина, 4

Поступила в редакцию 26.05.2005 г.

Принята в печать 30.08.2005 г.

Методом высокочувствительной дифференциальной сканирующей калориметрии исследовано взаимодействие малого глобулярного белка лизоцима с термочувствительным сополимером N-изопропилакриламида и стиролсульфоната натрия при pH 4.6. В этих условиях сополимер и белок образуют полиэлектролитные комплексы. Комплексообразование влияет на конформационное состояние лизоцима. В зависимости от состава смеси на термограммах наблюдается один пик денатурации или два хорошо разрешенных пика, относящихся к денатурации свободного и связанного белка. Определены параметры денатурации (температура и энталпия) обеих форм лизоцима в зависимости от состава смеси. В смесях с малым содержанием лизоцима температура и энталпия денатурации связанного белка не зависят от состава смеси. При более высоком содержании белка оба параметра растут с повышением содержания белка. Получена изотерма связывания лизоцима сополимером при $64 \pm 1^\circ\text{C}$. Ее анализ показывает, что нативный белок занимает 24 эквивалентных реакционных центра полимерной матрицы. На макромолекулу белка в нативной конформации приходится около 10 заряженных звеньев сополимера. Разворнутая форма лизоцима взаимодействует дополнительно с гидрофобными группами сополимера.

ВВЕДЕНИЕ

Способность термочувствительных водорасстворимых полимеров обратимо изменять конформацию цепей и фазовое состояние в ответ на малые изменения температуры определило важное место этих систем в ряду "умных" полимеров [1–5]. Термически индуцированные конформационные и фазовые превращения в полимерных цепях и гелях позволяют обратимо изменять их сродство к амфи菲尔ным биологическим лиганда姆, например к пептидам и белкам. Контролируемая адсорбция белков на термочувствительных полимерах интенсивно изучается и лежит в основе новейших методов биоразделения [4, 6–8], аффинного осаждения ферментов [9–13], направленного транспорта терапевтических белков [5, 14] и т.д. Включение в структуру термочувствительного полимера функциональных групп, специфически взаимодействующих с теми или

иными центрами связывания молекулы белка, может обеспечить высокую эффективность и селективность связывания белкового лиганда [1, 11, 13, 15, 16].

При использовании термочувствительных полимеров для биоразделения ферментов центральными аспектами проблемы являются обеспечение каталитической функции фермента в связанном состоянии и сохранение способности полимерной матрицы к конформационным или фазовым превращениям при нагревании в пределах физиологического интервала температур. Эти задачи не являются тривиальными. Во-первых, связывание белка на протяженной матрице может сопровождаться снижением его конформационной стабильности [17]. Другое осложнение может возникнуть в связи с тем, что при введении зарядов в цепь термочувствительного полимера температура его осаждения заметно возрастает [18] и может приблизиться к температуре денатурации связанного фермента, что повышает риск его инактивации.

¹ Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Государственного фонда естественных наук Китая (код проекта 02-03-39005) и фонда INTAS (грант 01-0673).

E-mail: burova@ineos.ac.ru (Бурова Татьяна Васильевна).

Таким образом, очевидно, что для эффективного разделения ферментов с помощью термочувствительных полимеров необходим тщательный контроль конформационного состояния связанного фермента и термочувствительных свойств полимерной матрицы. Несмотря на большой объем исследований в области адсорбции белков на термочувствительных полимерах, сведения о конформационном состоянии белка, связанного с полимерной матрицей, в литературе практически отсутствуют. Имеются лишь ограниченные данные, в основном полученные косвенными методами [19–22].

Мы исследовали комплексообразование малого глобулярного белка (лизоцима куриного яйца) с термочувствительным сополимером N-изопропилакриламид (НИПА)-стиролсульфонат натрия (ССН) методом высокочувствительной ДСК [23]. Калориметрические данные показывают, что комплексообразование приводит к изменению как конформационной стабильности фермента, так и фазового перехода сополимера.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Сополимер НИПА–ССН получали свободнорадикальной полимеризацией. В качестве инициатора использовали персульфат калия. Реакцию проводили в деионизированной воде при 70°C в течение 24 ч. После завершения реакции реакционную смесь дialisировали в течение 4 дней против деионизированной воды через полупроницаемую мембрану с пределом пропускания по $M = 1.4 \times 10^4$ для удаления непрореагировавших мономеров и низкомолекулярных полимеров. После дialisа сополимер концентрировали с помощью роторного испарителя и лиофильно высушивали при 40°C в течение 72 ч. ММ сополимера определяли светорассеянием в растворе NaCl. Химический состав сополимера характеризовали методом ЯМР.

Смеси сополимера и белка готовили из запасных растворов в ацетатном буфере с концентрацией 10 ммоль/л при pH 4.6. Запасной раствор сополимера получали растворением сухой навески в буфере. Концентрацию сополимера в запасном растворе определяли по весу. Запасной раствор белка получали дialisом против ацетатного буфера в течение суток при 4°C. Концентрацию белка в запасном растворе измеряли по поглоще-

нию при 280 нм и коэффициенту экстинкции $E^{1\text{cm}} = 2.65$ мл/мг [24]. Состав смесей варьировали путем изменения концентрации лизоцима, поддерживая концентрацию сополимера постоянной и равной 2 мг/мл.

Калориметрические измерения проводили на дифференциальных адиабатических сканирующих микрокалориметрах ДАСМ-4 и ДАСМ-4А (Научно-производственное объединение “Биоприбор”, Пущино) в интервале 10–130°C при избыточном давлении 2.5 атм и скорости нагревания 1 град/мин. Первичную обработку термограмм осуществляли с использованием программы WSCAL (Институт белка РАН, Пущино). Температурные зависимости парциальной теплоемкости преобразовывали в функции избыточной теплоемкости перехода с помощью программы НАИРТА (Институт биохимической физики РАН, Москва). За температуру фазового перехода сополимера T_f и денатурации белка T_d принимали температуру максимума соответствующей кривой избыточной теплоемкости. Энталпию фазового перехода сополимера $\Delta_f h$ и денатурации белка $\Delta_d h$ определяли интегрированием соответствующей кривой избыточной теплоемкости. При этом базовую линию в области перехода получали сплайн-интерполяцией. Ширину фазового перехода сополимера $\Delta_f T$ вычисляли как ширину пика избыточной теплоемкости перехода на его полувысоте.

Для деконволюции кривых избыточной теплоемкости денатурации белка, находящегося в свободном и связанном состояниях, использовали программу TableCurve 2D v.5.01 (SYSTAT Software Inc.). При этом допускали, что профиль перехода свободного и связанного белка аппроксимируется функцией Пирсона

$$c_{p, \text{exc}} = \text{PEARSON4_}(A1, A2, A3, A4, A5),$$

где $A1$ – максимальная ордината пика теплоемкости, $A2$ – температура максимума пика, $A3$ – полуширина пика, $A4$ и $A5$ – параметры симметрии пика. Профиль денатурации лизоцима в комплексе с сополимером аппроксимировали суммой

$$c_{p, \text{exc}} = w_{\text{prot}}^{\text{bound}} c_{p, \text{exc}}^{\text{bound}} + (1 - w_{\text{prot}}^{\text{bound}}) c_{p, \text{exc}}^{\text{free}}$$

Здесь $c_{p, \text{exc}}^{\text{bound}}$ и $c_{p, \text{exc}}^{\text{free}}$ – функции избыточной теплоемкости связанного и свободного белка соответ-

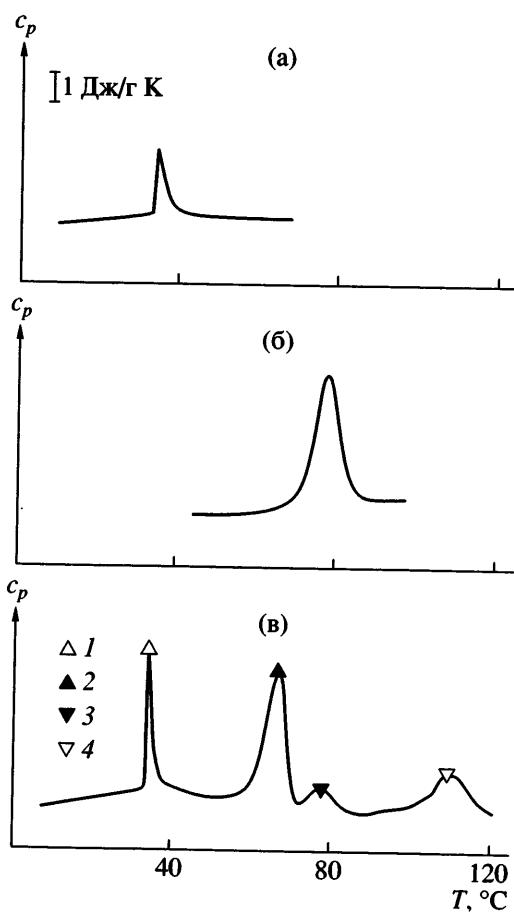


Рис. 1. Термограммы сополимера НИПА–ССН (а), лизоцима (б) и смеси лизоцим–сополимер (в) при pH 4.6. Концентрация сополимера 2 мг/мл; $r = 1.7$; ацетатный буфер 10 ммоль/л. Кривые смещены произвольно вдоль оси ординат: 1 – фазовый переход сополимера, 2 – денатурация связанных белка, 3 – денатурация свободного белка, 4 – плавление белковых кластеров.

ственno, $w_{\text{prot}}^{\text{bound}}$ – доля связанных белка. Для аппроксимации денатурационного перехода свободного белка в смеси параметры $A1, A3, A4$ и $A5$ функции $c_{p, \text{exc}}^{\text{free}}$ определяли по экспериментальному профилю денатурации лизоцима в фоновом буфере. Параметр $A2$, т.е. температура денатурации свободного белка в смеси с сополимером, был подгоночным. Для аппроксимации денатурационного перехода связанных белка в комплексе подгоночными параметрами служили параметры $A1, A2, A3, A4$ и $A5$ функции $c_{p, \text{exc}}^{\text{bound}}$.

Оптическую плотность определяли на спектрофотометре Genesys 2 (ThermoSpectronic, США).

Для турбидиметрических измерений использовали смеси с концентрацией сополимера 0.2 мг/мл. Мутность систем определяли на длине волны 436 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние комплексообразования на фазовый переход сополимера

По данным светорассеяния, ММ сополимера НИПА–ССН равна 2.45×10^5 . По данным ЯМР, содержание заряженных мономерных звеньев ССН в нем составляет 16.8 мол. %. НКТС сополимера в водном растворе равна 34.6°C .

Калориметрические данные были получены для смесей лизоцим–сополимер различного состава при pH 4.6. При этом значении pH белок и полимер заряжены противоположно. Для характеристики состава смеси использовали (в зависимости от удобства представления данных) либо отношение массовых концентраций белка и сополимера $r = [\text{лизоцим}]:[\text{НИПА–ССН}]$, либо условную массовую долю сополимера $w_{\text{pol}}^{\text{tot}} = 1/(1+r)$.

На рис. 1 приведены термограммы сополимера НИПА–ССН, лизоцима и их смеси ($r = 1.75$) при pH 4.6. Термограмма сополимера (кривая а) содержит пик теплоемкости при 34°C , соответствующий фазовому расслоению системы полимер–вода. Переход сопровождается эндотермическим тепловым эффектом $\Delta_h = 7 \text{ Дж/г}$. Термограмма лизоцима (кривая б) имеет пик теплоемкости при 78°C , соответствующий денатурации белка. Тепловой эффект денатурации $\Delta_d h$ в данных условиях составляет 35 Дж/г . На термограмме смеси белок–сополимер (кривая в) видны четыре пика теплоемкости. Пик 1 при 34°C отвечает, очевидно, фазовому переходу сополимера. Пики 2 и 3 при 67 и 78°C относятся к денатурации белка в комплексе с полимерной матрицей и в свободном состоянии соответственно. Наконец, пик 4 при 109°C можно отнести, по всей вероятности, к кооперативному плавлению кластеров денатурированного белка. Поскольку температура денатурации лизоцима выше температуры фазового перехода сополимера, приведенные калориметрические данные для лизоцима относятся к денатурации белка в условиях фазового разделения системы. При этом очевидно, что свободный белок будет находиться преиму-

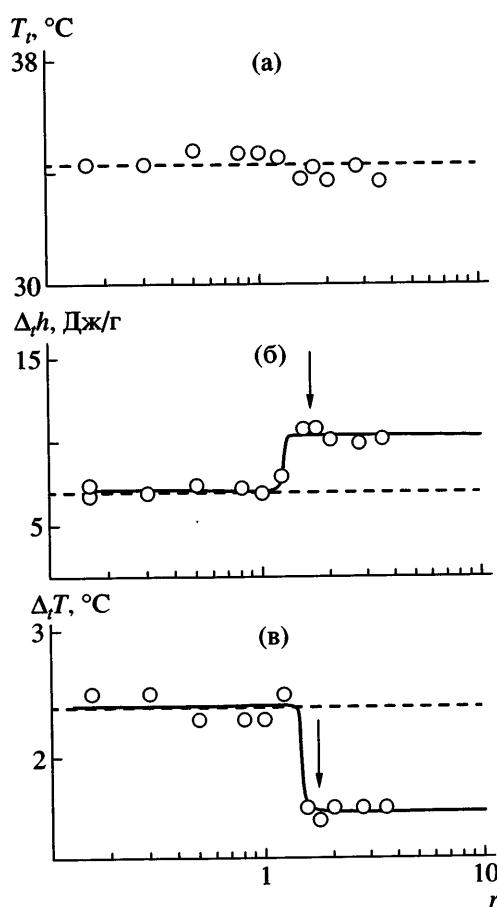


Рис. 2. Зависимости температуры (а), энталпии (б) и ширины (в) фазового перехода сополимера НИПА–ССН в смесях с лизоцимом от состава смеси. pH 4.6, ацетатный буфер 10 ммоль/л. Штриховые линии показывают значения соответствующих параметров сополимера в фоновом буфере. Стрелками отмечен состав смеси, отвечающий условию электронейтральности комплекса лизоцим–сополимер. Пояснения в тексте.

щественно в разбавленной фазе, а связанный – в концентрированной фазе сополимера.

На рис. 2 приведены основные калориметрические параметры фазового перехода сополимера НИПА–ССН в смеси с лизоцимом в зависимости от состава смеси. Штриховые линии показывают значения этих параметров для сополимера в фоновом буфере. Температура фазового перехода T_r сополимера в смеси с белком практически не отличается от температуры перехода полимера в отсутствие белка (рис. 2а). Энталпия перехода Δ_h при малом содержании белка ($r \leq 1$) совпадает с энталпийей перехода полимера в фоновом буфере (рис. 2б). Затем в узком интервале значений

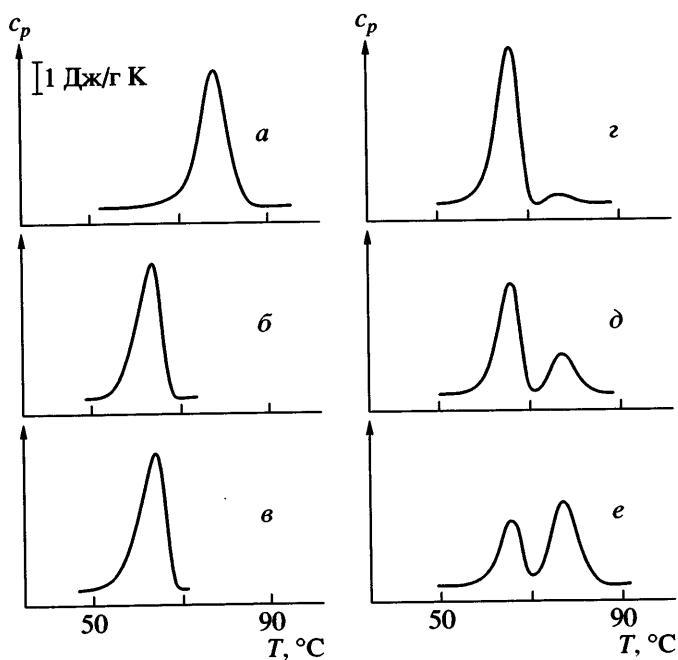


Рис. 3. Термограммы денатурации лизоцима в фоновом буфере (а) и в смесях с сополимером НИПА–ССН (б–е). $r = 0.5$ (б), 1.0 (в), 1.5 (г), 2.0 (д) и 3.5 (е). pH 4.6, ацетатный буфер 10 ммоль/л.

$r = 1.0\text{--}1.5$ она резко возрастает и при дальнейшем увеличении r остается постоянной. Ширина перехода $\Delta_r T$ сополимера в смеси нечувствительна к присутствию белка вплоть до $r \sim 1$, затем резко уменьшается до некоторого постоянного уровня (рис. 2в). Это означает, что с повышением содержания белка в смеси фазовый переход сополимера становится более кооперативным.

Полученные тенденции изменения параметров фазового перехода сополимера НИПА–ССН в смесях с лизоцимом отражают процесс нейтрализации заряженных групп сополимера при комплексообразовании с противоположно заряженным белком. Как правило, фазовый переход в нейтральных гомополимерах НИПА протекает более кооперативно и с большим тепловым эффектом, чем в сополимерах НИПА с заряженными мономерными звеньями.

Влияние комплексообразования на конформационную стабильность лизоцима

Рассмотрим конформационные изменения белка при комплексообразовании с полимерной матрицей. На рис. 3 приведены кривые избыточ-

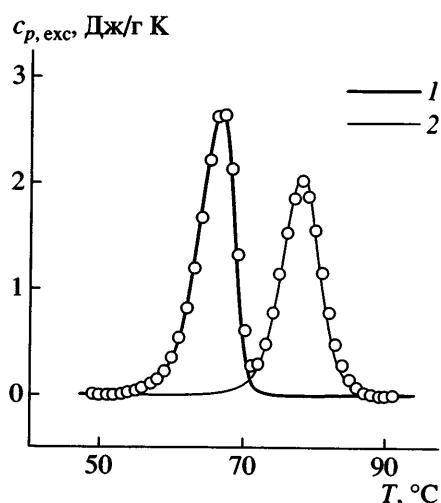


Рис. 4. Пример деконволюции кривой избыточной теплоемкости лизоцима в смеси с сополимером НИПА–ССН при $r = 2.7$. Точки – экспериментальные данные; 1 – вклад связанного белка, 2 – вклад свободного белка. pH 4.6, ацетатный буфер 10 ммоль/л.

ной теплоемкости лизоцима в фоновом буфере (кривая a) и в смесях с сополимером НИПА–ССН различного состава (кривые b – e). Денатурация свободного белка при pH 4.6 проявляется на термограмме в виде единственного симметричного пика теплоемкости с максимумом при 78°C. На термограмме смеси с малым содержанием белка наблюдается один пик теплоемкости с максимумом при 63°C (кривая b). При увеличении параметра r вплоть до $r = 1$ положение и профиль пика остаются практически неизменными (кривая c). Начиная с $r = 1.5$, на термограмме появляется второй пик около 78°C (кривая d). При дальнейшем увеличении содержания белка второй пик становится более отчетливым, а первый убывает по высоте (кривая e). Наконец, при $r = 3.45$ соотношение высот пиков меняется на обратное: первый пик становится меньше второго (кривая e). При этом положение обоих пиков теплоемкости по шкале температур меняется слабо.

Очевидно, в смеси белок находится в двух состояниях – свободном и связанном с полимерной матрицей. Естественно предположить, что пик теплоемкости при 78°C соответствует денатурации свободного белка, а пик при 63°C – денатурации связанного. В таком случае, смеси с $r < 1.5$ содержат только связанный белок, а при $r \geq 1.5$ в системе сосуществуют свободный и связанный белок.

Был разработан алгоритм деконволюции кривых избыточной теплоемкости денатурации белка для системы, содержащей свободный и связанный белок. Основу алгоритма составляют следующие допущения: параметры денатурации свободного белка не зависят от присутствия в системе комплексов белок–полимер; профиль избыточной теплоемкости денатурации для свободного и связанного лизоцима описывается одной и той же функцией (функцией Пирсона). В таком приближении варьируемыми параметрами деконволюции термограмм денатурации были температура, энталпия, ширину и параметр асимметрии перехода связанного белка, а также температура перехода и доля свободного белка в смеси. Энталпию, ширину и параметр асимметрии пика денатурации свободного белка определяли по кривой избыточной теплоемкости белка в фоновом буфере (в отсутствие полимера).

На рис. 4 приведен пример деконволюции кривой избыточной теплоемкости денатурации лизоцима в смеси с НИПА–ССН при $r = 2.7$. Видно, что расчетная кривая хорошо описывает экспериментальный профиль перехода (точки). В результате деконволюции были определены параметры денатурации связанного белка, его массовая доля в смеси и вычислен вклад связанного (кривая 1) и свободного (кривая 2) белка в избыточную теплоемкость смеси.

Параметры денатурации лизоцима в комплексах с сополимером НИПА–ССН в зависимости от состава смеси r представлены на рис. 5. Штриховые линии показывают значения T_d и $\Delta_d h$ для лизоцима в фоновом буфере в отсутствие полимера. Как видно на рис. 5а, температура денатурации связанного белка возрастает по сигмоиде с повышением содержания белка в комплексе, оставаясь ниже температуры денатурации свободного белка. Температура денатурации свободного лизоцима в смесях при $r > 1.5$ не зависит от состава комплексов и равна температуре денатурации белка в отсутствие полимера. Энталпия денатурации связанного лизоцима при малых r меньше энталпии денатурации свободного белка (рис. 5б). С увеличением содержания белка в комплексах энталпия связанного белка повышается, приближаясь к энталпии денатурации свободного лизоцима. В целом, с ростом содержания белка в смеси изменения температуры и энталпии денатура-

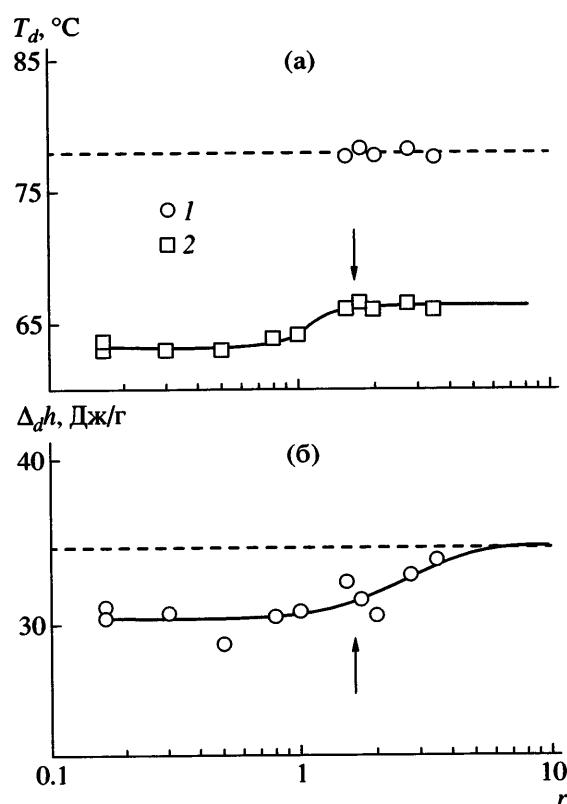


Рис. 5. Термодинамические параметры денатурации лизоцима в смесях с сополимером НИПА–ССН разного состава: (а) – температура денатурации свободного (1) и связанного белка (2); (б) – суммарная энталпия денатурации. Штриховые линии показывают значения соответствующих параметров для лизоцима в фоновом буфере. pH 4.6, ацетатный буфер 10 ммоль/л. Стрелкой отмечен состав смеси, отвечающий условию электронейтральности комплекса лизоцим–сополимер. Пояснения в тексте.

ции лизоцима, связанного с полимерной матрицей, симбатны.

Таким образом, можно выделить две тенденции в изменении конформационной стабильности лизоцима при комплексообразовании с заряженным сополимером. Во-первых, стабильность белка в комплексе ниже, чем в свободном состоянии. Во-вторых, начиная с некоторой величины состава смеси, стабильность белка в комплексе повышается с увеличением содержания белка. Первый эффект достаточно общий и был отмечен для ряда глобулярных белков, связанных с полиэлектролитами [17, 25]. Он обусловлен предпочтительным связыванием развернутой формы белка на множественных центрах связывания полимерной матрицы. Второй эффект коррелирует с измене-

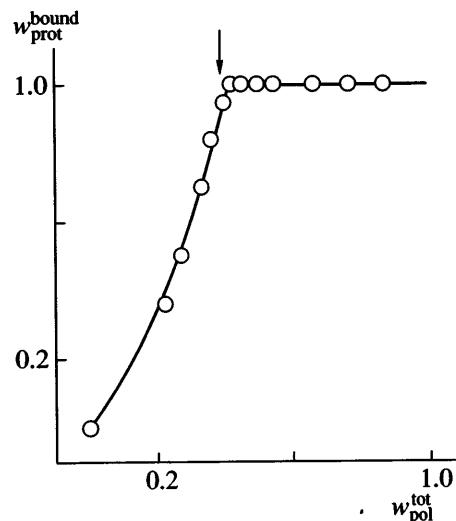


Рис. 6. Изотерма связывания лизоцима сополимером НИПА–ССН при 64 ± 1 °C: $w_{\text{prot}}^{\text{bound}}$ – доля связанного белка, $w_{\text{pol}}^{\text{tot}}$ – условная массовая доля сополимера; точки – экспериментальные данные, сплошная линия – модель связывания на идентичных независимых центрах. pH 4.6, ацетатный буфер 10 ммоль/л. Стрелкой отмечен состав смеси, отвечающий условию электронейтральности комплекса лизоцим–сополимер. Пояснения в тексте.

ниями фазового перехода сополимера. Сравнивая рис. 2 и 5, можно отметить симбатность изменения параметров перехода сополимера и белка в комплексах в зависимости от состава смеси r . При $r < 1.5$ параметры перехода обоих компонентов комплекса не зависят от его состава. Начиная с $r \sim 1.5$, наблюдается довольно резкое изменение энталпии и ширины фазового перехода сополимера (рис. 2б, 2в), а также температуры и энталпии денатурации связанного лизоцима (рис. 5). Кроме того, значение $r \sim 1$ отвечает составу комплекса, начиная с которого в системе появляется свободный белок (рис. 3). Очевидно, что состав комплекса с $r \sim 1.5$ соответствует насыщению полимерной матрицы белком и ее нейтрализации.

Параметры связывания лизоцима полимерной матрицей

Деконволюция кривых избыточной теплоемкости денатурации лизоцима в комплексах с сополимером НИПА–ССН позволила определить содержание свободного и связанного белка в зависимости от состава смеси. На рис. 6 приведена изотерма связывания лизоцима сополимером

НИПА-ССН при pH 4.6. Она представляет собой зависимость доли связанного белка от массовой доли сополимера в смеси. Эта кривая была аппроксимирована по модели связывания Ленгмюра [26]. Модель предполагает, что связывание лиганда (белка в нашем случае) осуществляется на независимых идентичных центрах связывания матрицы. Константа связывания K_b и число эквивалентных центров связывания n служили варьируемыми параметрами при аппроксимации экспериментальных данных. Теоретическая кривая наилучшего приближения показана на рис. 6 сплошной линией. Ей соответствуют значения параметров связывания $K_b \sim 10^6$ л/моль и $n = 24 \pm 1$. Следует учесть, что данная аппроксимация экспериментальных данных позволяет надежно оценить лишь параметр n , в то время как константа связывания оценивается лишь по порядку величины. Тем не менее, все же можно утверждать, что взаимодействие лизоцима с сополимером следует рассматривать как сильное связывание, поскольку в широком интервале состава смеси лизоцим-(сополимер НИПА-ССН) отсутствует свободный белок.

Представляет интерес сопоставить экспериментальное значение числа эквивалентных центров связывания n с оценкой этой величины из предположения об электронейтральности комплекса, в котором реализованы все потенциальные центры связывания. Из мономерного состава сополимера (16.8 мол. % ССН и 83.2 мол. % НИПА) следует, что число звеньев ССН в макромолекуле сополимера равно 320. Согласно данным потенциометрического титрования лизоцима [27], заряд этого белка при pH 4.6 равен +11. Следовательно, условию электронейтральности соответствует комплекс, в котором на одну молекулу сополимера приходится 29 молекул лизоцима. Это значение согласуется с числом эквивалентных центров связывания $n = 24$, определенным из изотермы связывания (рис. 6). Полученный результат указывает на то, что связывание лизоцима полимером носит кооперативный характер, т.е. каждая молекула нативного белка в комплексе связана с ~10 заряженными звеньями полимерной матрицы. Состав электронейтрального комплекса, выраженный отношением массовых концентраций белка и сополимера, отвечает составу смеси $r = 1.68$. Это значение состава смеси отмечено стрелками на рис. 2б, 2в и рис. 5. Видно, что

условию электронейтральности комплекса соответствуют резкие изменения энталпии и ширины фазового перехода сополимера, а также температуры и энталпии связанного белка.

Выше было отмечено, что понижение температуры денатурации белка, связанного с полимером, указывает на предпочтительное взаимодействие развернутой формы белка с матрицей. Эта тенденция сохраняется и в условиях электронейтрального комплекса (рис. 5а), т.е. когда все заряженные центры матрицы заняты свернутой формой белка. При этом для реализации предпочтительного связывания развернутой формы белка на матрице не остается заряженных групп. Отсюда следует, что в данном случае предпочтительное связывание денатурированной формы белка обусловлено, по-видимому, взаимодействием гидрофобных групп белка и сополимера.

В области состава смеси лизоцим-сополимер, отвечающей электронейтральному комплексу, температура денатурации связанного белка несколько превышает температуру денатурации белка в комплексе с некомпенсированным зарядом матрицы (рис. 5а). Возможно, такой результат отражает различие свойств концентрированных фаз заряженных и незаряженных полимерных комплексов. Нейтральные полимеры выше НКТС образуют более плотные концентрированные фазы, чем заряженные полимеры. Вероятно, что макромолекула белка в плотном окружении будет более стабильна по отношению к разворачиванию в силу эффекта исключенного объема. Этим, возможно, объясняется небольшое повышение температуры денатурации белка в электронейтральном комплексе.

Приведенная на рис. 1 термограмма смеси лизоцим-(сополимер НИПА-ССН) содержит высокотемпературный пик теплоемкости при 109°C, который отсутствует на термограммах отдельных компонентов смеси. Очевидно, этот переход отражает плавление некоторой кооперативной структуры, включающей денатурированный белок и полимер. Интересно, что данная структура, образованная при температурах выше 70°C, сохраняется при охлаждении до комнатной температуры. Об этом свидетельствует наличие высокотемпературного кооперативного пика теплоемкости для смеси лизоцим-(сополимер НИПА-

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

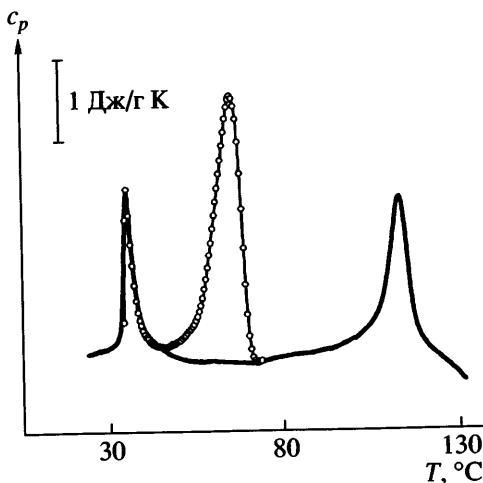


Рис. 7. Термограммы повторных сканирований смеси лизоцим–(сополимер НИПА–ССН) при $r = 1.2$. Точки – первое сканирование от 10 до 75°C, сплошная линия – второе сканирование от 10 до 130°C. pH 4.6, ацетатный буфер 10 мМоль/л.

ССН), которая была предварительно нагрета до 75°C и затем охлаждена до 10°C (рис. 7).

Известно, что термическая денатурация белка в разбавленном растворе сопровождается образованием агрегатов денатурированного белка (термокластеров). В большинстве известных случаев белковые термокластеры не обладают упорядоченной структурой. Однако отмечены примеры белковых термокластеров, проявляющих признаки упорядоченности. Так, было обнаружено кооперативное плавление термокластеров овальбумина, образованных в слабокислой водной среде [28]. Структурные исследования показали, что термокластеры овальбумина в этих условиях имеют упорядоченную (линейную) структуру [29, 30]. Было отмечено, что образованию такой структуры из развернутых макромолекул белка способствует их низкая функциональность (высокий заряд и низкая ионная сила). Применительно к комплексам лизоцим–сополимер можно ожидать, что линейная полимерная матрица, фиксирующая развернутый белок по заряженным и гидрофобным центрам, существенно ограничивает его функциональность и вносит пространственный вектор в процесс образования термокластеров. В результате образуются термокластеры с упорядоченной структурой, о чем свидетельствует их довольно высокий тепловой эффект плавления (около 12 Дж/г) (рис. 1, 7).

Сополимер N-изопропилакриламида и стиролсульфоната натрия образует полиэлектролитные комплексы с лизоцимом. Растворимость комплексов повышается с ростом массовой доли сополимера в смеси. Свернутая (нативная) форма лизоцима связывается преимущественно на заряженных центрах связывания матрицы, причем при pH 4.6 на одну молекулу белка приходится ~10 заряженных звеньев сополимера. Развернутая (денатурированная) форма лизоцима связывается дополнительно на гидрофобных центрах связывания сополимера. Лизоцим, связанный сополимером, сохраняет нативную третичную структуру, которая, однако, несколько дестабилизирована по сравнению со структурой свободного белка. Тем не менее, можно ожидать, что фермент в комплексе может обладать ферментативной активностью. Фазовый переход сополимера происходит при температурах, существенно ниже температуры денатурации белка в комплексе. Это свойство системы может быть использовано для простого выделения (концентрирования) ферментов из разбавленных растворов или смесей биополимеров. В результате взаимодействия развернутых макромолекул белка с сополимером образуются упорядоченные структуры, обладающие кооперативными свойствами. Дальнейшее изучение механизма образования и свойств таких структур представляет несомненный интерес для биоинженерии и бионанотехнологии.

Авторы выражают глубокую признательность профессорам Ч. Ву и Г. Жангу (Университет науки и технологии Китая, Хайфей, Китайская Народная Республика) за постановку интересной задачи, синтез и характеристику сополимера N-изопропилакриламид–стиролсульфонат натрия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bromberg L.E., Ron E.S. // Adv. Drug Delivery Rev. 1998. V. 31. № 3. P. 197.
2. Kanazawa H., Matsushima Y. // Yakugaku Zasshi. 1997. V. 117. № 10–11. P. 817.
3. Kanazawa H., Yamamoto K., Kashiwase Y., Matsushima Y., Takai N., Kikuchi A., Sakurai Y., Okano T. // J. Pharmaceut. Biomed. 1997. V. 15. № 9–10. P. 1545.

4. Kim J.J., Park K. // Bioseparation. 1998. V. 7. № 4–5. P. 177.
5. Uludag H., Norrie B., Kousinioris N., Gao T.J. // Biotechnol. Bioeng. 2002. V. 73. № 6. P. 510.
6. Choi Y.J., Yamaguchi T., Nakao S. // Ind. Eng Chem. Res. 2000. V. 39. № 7. P. 2491.
7. Hoffman A.S. // Clin. Chem. 2000. V. 46. № 9. P. 1478.
8. Yang H.H., Zhu Q.Z., Li D.H., Chen L.X., Ding M.T., Xu J.G. // Anal. Chim. Acta. 2002. V. 435. № 2. P. 265.
9. Galaev I.Y., Kumar A., Mattiasson B. // J. Macromol. Sci. A. 1999. V. 36. № 7–8. P. 1093.
10. Glatz Z. // Chem. Listy. 2000. V. 94. № 6. P. 389.
11. Kumar A., Galaev I.Y., Mattiasson B. // Bioseparation. 1998. V. 7. № 4–5. P. 185.
12. Kumar A., Galaev I.Y., Mattiasson B. // Biotechnol. Bioeng. 1998. V. 59. № 6. P. 695.
13. Mattiasson B., Kumar A., Galaev I.Y. // J. Mol. Recognit. 1998. V. 11. № 1–6. P. 211.
14. Bulmus V., Ding Z.L., Long C.J., Stayton P.S., Hoffman A.S. // Bioconjugate Chem. 2000. V. 11. № 1. P. 78.
15. Kato K., Furukawa M., Kanzaki Y., Hoffman A.S., Nakamae K. // Kobunshi Ronbunshu. 1998. V. 55. № 6. P. 353.
16. Vaidya A.A., Lele B.S., Kulkarni M.G., Mashelkar R.A. // J. Biotechnol. 2002. V. 87. № 2. P. 95.
17. Burova T.V., Varfolomeeva E.P., Grinberg V.Y., Haertle T., Tolstoguzov V.B. // Macromol. Biosci. 2002. V. 2. № 6. P. 286.
18. Schild H.G. // Progr. Polym. Sci. 1992. V. 17. P. 163.
19. Ramkissoon-Ganorkar C., Liu F., Baudys M., Kim S.W. // J. Control. Release. 1999. V. 59. № 3. P. 287.
20. Lin S.C., Lin K.L., Chiu H.C., Lin S.Y. // Biotechnol. Bioeng. 2000. V. 67. № 5. P. 505.
21. Moseley J., Wu X.Y., Nicholov R., Kodaria K. // J. Biomat. Sci. E. 2000. V. 11. № 2. P. 123.
22. Ramkissoon-Ganorkar C., Baudys M., Kim S.W. // J. Biomat. Sci. E. 2000. V. 11. № 1. P. 45.
23. Privalov P.L., Potekhin S.A. // Methods Enzymol. 1986. V. 131. P. 4.
24. Pace C.N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., Gray T. // Protein Sci. 1995. V. 4. № 11. P. 2411.
25. Ivinova O.N., Izumrudov V.A., Muronetz V.I., Galaev I.Y., Mattiasson B. // Macromol. Biosci. 2003. V. 3. № 3–4. P. 210.
26. Langmuir I. // J. Am. Chem. Soc. 1918. V. 40. № 9. P. 1361.
27. Yang A.-S., Honig B. // J. Mol. Biol. 1993. V. 231. P. 459.
28. Grinberg V.Ya., Burova T.V., Grinberg N.V., Mashkevich A.Ya. // Food Proteins: Structure and Functionality / Ed. by Schwenke K.D., Mothes R. Weinheim: VCH, 1993. P. 42.
29. Koseki T., Kitabatake N., Doi E. // Food Hydrocolloids. 1989. V. 3. P. 123.
30. Koseki T., Fukuda T., Kitabatake N., Doi E. // Food Hydrocolloids. 1989. V. 3. P. 135.

Conformational and Phase Transitions in Lysozyme–Thermosensitive Polyelectrolyte Complexes

T. V. Burova, N. V. Grinberg, and V. Ya. Grinberg

Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences,
ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

Abstract—The interaction of a small globular protein, lysozyme, with a thermosensitive N-isopropylacrylamide–sodium styrene sulfonate copolymer at pH 4.6 was studied by high-sensitivity differential scanning calorimetry. It was shown that under these conditions, the copolymer and the protein are involved in formation of polyelectrolyte complexes. It was demonstrated that complexation affects the conformational state of lysozyme. One heat capacity peak attributed to protein denaturation or two well-resolved peaks related to denaturation of free and bound proteins were observed in the DSC curves depending on the mixture composition. For both forms of lysozyme, denaturation parameters (temperature and enthalpy) were determined as a function of mixture composition. For mixtures with low lysozyme contents, the above parameters of bound protein denaturation were independent of the mixture composition. At higher protein contents, these parameters increased with a rise in the protein content. The binding isotherm for the protein with the copolymer was measured at $64 \pm 1^\circ\text{C}$. An analysis of the isotherm suggests that the native protein is bound to 24 equivalent reactive sites of the polymer matrix. It was established that there are nearly 10 charged units of the copolymer per protein molecule in the native conformation. Lysozyme occurring in the unfolded conformation additionally interacts with hydrophobic groups of the copolymer.