



УДК 577.152.049

## ВЛИЯНИЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ НА СВОЙСТВА ПЕНИЦИЛЛИНАМИДАЗЫ И ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ

*Стрельцова З. А., Швядас В. К., Максименко А. В.,  
Клесов А. А., Браудо Е. Е., Толстогозов В. Б.,  
Березин И. В.*

*Институт элементоорганических соединений  
Академии наук СССР, Москва*

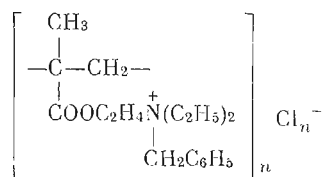
*Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова*

Исследовано влияние полнэлектролитов на каталитические свойства пенициллин-амидазы из *E. coli* и щелочной фосфатазы из кипячника цыпленка. Наблюдаемые эффекты могут быть практически полностью объяснены изменением рН микроокружения фермента, связанного с полиэлектролитом, по сравнению с рН основного раствора. Предполагается, что этот эффект является общим для различных систем фермент — полиэлектролит.

Комплексы белков с полиэлектролитами, такими, как кислые полисахариды, нуклеиновые кислоты и др., являются распространенными элементами различных биологических систем. Однако в настоящее время мало известно, каким образом изменяются свойства белков в результате взаимодействия с полиэлектролитами, хотя в ряде работ эта проблема исследовалась [1—6].

Удобными объектами для такого рода исследований являются ферменты, поскольку их каталитическая активность является параметром, весьма чувствительным к изменениям как структуры их белковых глобул, так и к свойствам окружающей среды.

Ранее [7, 8] нами было показано, что влияние полианионов на каталитические свойства  $\alpha$ - и  $\delta$ -химотрипсина, а также трипсина может быть полностью объяснено влиянием электростатического поля полианиона на константы ионизации ионогенных групп ферментов, участвующих в каталитической реакции, и на распределение реагентов в сфере действия макромолекулы полиэлектролита. Величина сдвига  $pK$  какой-либо ионогенной группы фермента коррелирует со значением его электростатического потенциала. В данной работе исследовано влияние полиэлектролитов на свойства пенициллин-амидазы (пенициллин-амидогидролаза, КФ 3.5.1.11) из *E. coli* и щелочной фосфатазы (фосфогидролаза моноэфиров ортофосфата, КФ 3.1.3.1) из кишечника цыпленка. В качестве полиэлектролитов использовали декстрансульфат натрия (ДСН) и синтетический поликатион (СПК), строение которого соответствует формуле



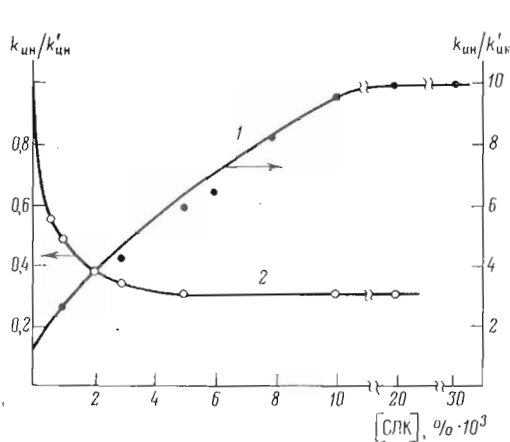


Рис. 1

Рис. 1. Влияние СПК на константу скорости термоинактивации пенициллинамидазы при рН 6,0 (1) и рН 7,0 (2) ( $k_{ин}$  и  $k'_{ин}$  константы скорости инактивации в отсутствие и в присутствии СПК)

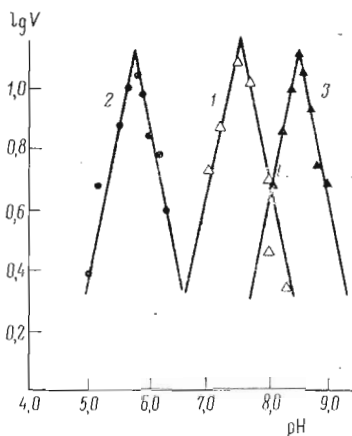


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость  $V$  гидролиза бензилпенициллина, катализируемого пенициллинамидазой от рН, в отсутствие полиэлектrolита (1), в присутствии 0,1% СПК (2), в присутствии 0,01% ДСН (3). Тангенс угла наклона прямых равен +1 или -1

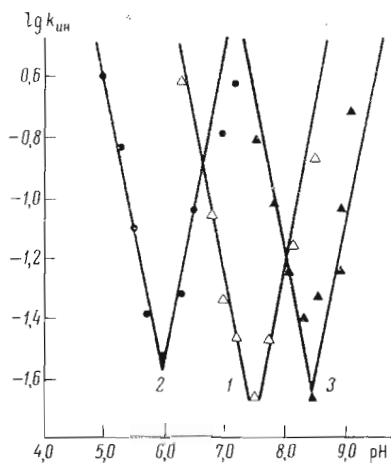


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость константы скорости термоинактивации пенициллинамидазы от рН в отсутствие полиэлектrolита (1), в присутствии 0,1% СПК (2), в присутствии 0,01% ДСН (3). Тангенс угла наклона прямых равен +1 или -1

Изучено влияние ДСН и СПК на максимальную скорость гидролиза бензилпенициллина, катализируемого пенициллинамидазой, и на скорость термоинактивации пенициллинамидазы, а также влияние СПК на кинетические параметры гидролиза *n*-нитрофенилфосфата натрия (НФФН), катализируемого щелочной фосфатазой.

Для всех систем, исследованных ранее [7, 8] и в данной работе, графики зависимости влияния концентрации полиэлектrolита на какое-либо свойство фермента имеют область, в которой величина наблюдаемого эффекта не зависит от концентрации полиэлектrolита (рис. 1). Эта область соответствует практически полному включению фермента в комплекс, и, следовательно, параметры, измеряемые при этих условиях, являются свойствами комплекса фермент — полиэлектrolит.

На рис. 2 и 3 представлены зависимости максимальной скорости  $V$  гидролиза бензилпенициллина, катализируемого пенициллинамидазой, и константы скорости термоинактивации  $k_{ин}$  для нативной пенициллинамидазы и ее комплексов с ДСН и СПК от рН. Как видно из рис. 2, 3, кривые зависимостей  $V$  и  $k_{ин}$  от рН сдвигаются примерно на 1,5 ед. рН в кислую область под действием СПК и на 1,0 ед. в щелочную область под действием ДСН. Значения  $V$  и  $k_{ин}$ , соответствующие оптимальному рН, практически одинаковы во всех случаях.

Так как взаимодействие белок — полиэлектrolит является преимущественно электростатическим [9], то при значениях рН, на 2—3 ед. боль-

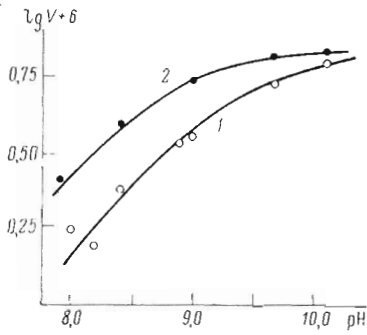


Рис. 4

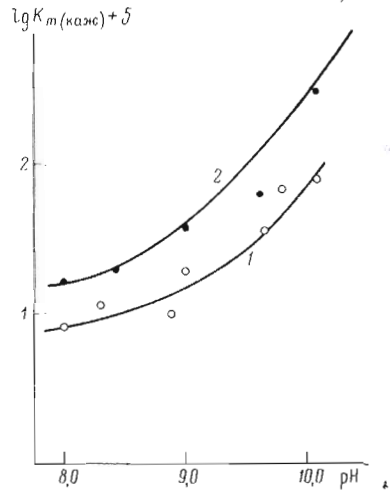


Рис. 6

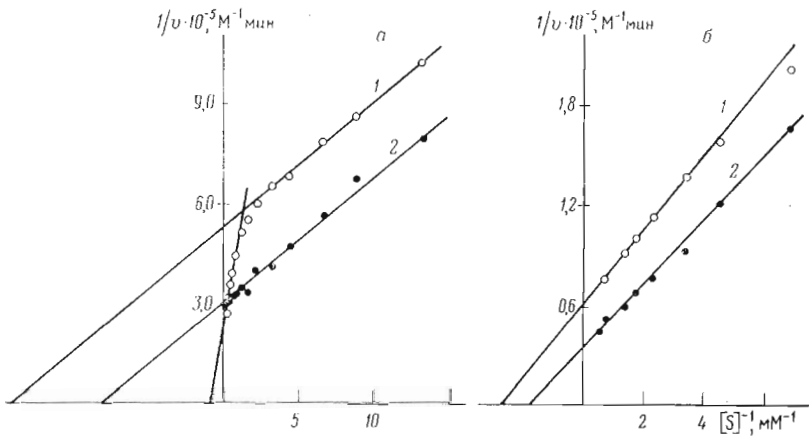


Рис. 5

Рис. 4. Зависимость  $V$  гидролиза НФФН, катализируемого щелочной фосфатазой, от рН в отсутствие полиэлектrolита (1) и в присутствии  $1,25 \cdot 10^{-3}\%$  СПК (2). Кривые теоретические. Построены по уравнению (1) в предположениях: 1:  $\lg V_{\text{lim}} + 6 = 0,83$ ; рК 9,3; 2:  $\lg V_{\text{lim}} + 6 = 0,83$ ; рК 8,8

Рис. 5. Влияние СПК на начальную скорость гидролиза НФФН под действием щелочной фосфатазы: а — при рН 8,00, б — при рН 9,65; 1 — реакция в отсутствие полиэлектrolита, 2 — в присутствии  $1,25 \cdot 10^{-3}\%$  СПК;  $-20^\circ\text{C}$

Рис. 6. Зависимость  $K_m(\text{каж})$  гидролиза НФФН, катализируемого щелочной фосфатазой, от рН в отсутствие полиэлектrolита (1) и в присутствии  $1,25 \cdot 10^{-3}\%$  СПК (2). Кривые теоретические. Построены по уравнению (2) в следующих предположениях: 1:  $\lg K_m(\text{каж})_{\text{lim}} + 5 = 0,9$ ; рК 9,7; 2:  $\lg K_m(\text{каж})_{\text{lim}} + 5 = 1,1$ ; рК 9,2

ших величины  $rI$ , белок не должен взаимодействовать с полианионами [10]. Это согласуется с тем, что в исследованном диапазоне рН на свойства щелочной фосфатазы,  $rI$  которой для ферментов из разных источников равен 3,9—4,6 [11, 12], оказывает влияние СПК, но не ДСН.

На рис. 4 приведены зависимости гидролиза НФФН, катализируемого щелочной фосфатазой, в отсутствие и в присутствии полиэлектrolита от рН. Как видно из рис. 4, экспериментальные точки, полученные для фер-

ментативной реакции в присутствии СПК, совпадают с теоретической кривой, построенной в предположении, что влияние СПК на  $V$  проявляется лишь в сдвиге  $pK$  ионогенной группы, контролирующей  $V$ , на 0,5 ед. в кислую область. (Следует отметить, что при использованной концентрации СПК только часть фермента находится в комплексе с полиэлектролитом и, следовательно, полученное значение сдвига  $pK$  является заниженным. Использование более высоких концентраций СПК делало невозможным спектрофотометрическое измерение скорости ферментативной реакции из-за увеличения оптической плотности реакционной смеси за счет образования нерастворимого комплекса фермент — СПК. Величина сдвига  $pK$ , вычисленная по данным, полученным в условиях насыщения, равна  $\sim 1$ .)

Активный центр щелочной фосфатазы содержит 2 неэквивалентных центра связывания субстрата [13, 14]. При  $pH > 8,5$  в фосфорилированном принимает участие только одна молекула субстрата, а второй центр или остается свободным, или нековалентно насыщен субстратом [14]. В более кислой области  $pH$  при низкой ионной силе возможно фосфорилирование фермента обеими связанными молекулами субстрата, что проявляется в наличии излома на кривой зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата, представленной в координатах Лайнуивера — Берка. Это явление иллюстрирует рис. 5, а. Под действием СПК излом на кривой зависимости  $1/v$  от  $1/[S]_0$  исчезает (рис. 5, а, прямая 2), и она приобретает вид, характерный для более высоких  $pH$  (см. рис. 5, б). Это явление может быть объяснено тем, что молекула фермента, связанная с СПК, так же как и в случае ковалентного связывания ферментов с положительно заряженными полиэлектролитами [15, 16], находится в среде с локальным  $pH$ , более высоким, чем окружающий раствор. Это должно также приводить к кажущемуся уменьшению  $pK$  ионогенных групп фермента, что и наблюдается для комплексов пенициллинамидазы — СПК и щелочная фосфатаза — СПК (см. рис. 2—4). С этим согласуется также наблюдаемое под действием полианионов увеличение  $pK$  ионогенных групп пенициллинамидазы (рис. 2,3), а также трипсина и химотрипсина [7, 8].

Влияние СПК и  $K_m$  (каж) гидролиза НФФН, катализируемого щелочной фосфатазой, является более сложным, и, кроме сдвига  $pH$ -зависимости на 0,5 ед.  $pH$  в кислую область, наблюдается незначительное (в 1,6 раза) увеличение  $K_m$  (каж)  $\lim$  (рис. 6). Последний эффект может быть связан с взаимодействием СПК с субстратом, однако, поскольку механизм действия щелочной фосфатазы сложный (предлагаемая в работе [14] схема включает в себя 6 стадий, скорости двух из которых могут зависеть от концентрации субстрата), однозначная интерпретация причин увеличения  $K_m$  (каж)  $\lim$  в настоящее время не представляется возможной.

Таким образом, взаимодействие полиэлектролитов со щелочной фосфатазой и пенициллинамидазой вызывает эффекты, объяснимые главным образом изменением  $pH$  микроокружения фермента, связанного с полиэлектролитом, по сравнению с  $pH$  окружающего раствора. На основании данных настоящей работы, а также предыдущих исследований [7, 8] можно высказать предположение, что этот эффект является общим для различных систем фермент — полиэлектролит.

### Экспериментальная часть

В работе использовали НФФН и щелочную фосфатазу фирмы «Reanal» (Венгрия), а также ДС ( $M_w$  500 000) фирмы «Pharmacia» (Швеция). СПК ( $M_w$  30 000—40 000, степень бензилирования 70%) синтезировали на кафедре пластмасс Московского химико-технологического института им. Д. И. Менделеева. Характеристики использованного препарата пенициллинамидазы, полученного во Всесоюзном научно-исследователь-

ском институте антибиотиков, а также бензилпенициллина приведены в работе [17].

Кинетику ферментативного гидролиза бензилпенициллина изучали с использованием рН-стата ТТТ-1с «Radiometer» (Дания), титруя 0,01 н. КОН образующуюся в реакции фенилуксусную кислоту. Для предотвращения адсорбции полиэлектролитов, искажающей показания, стеклянный электрод, в соответствии с рекомендацией фирмы, был обработан раствором триметилхлорсилана в бензоле. В условиях эксперимента выполнялось соотношение  $[S]_0 \gg K_m$  (как). Следовательно, измеряемая скорость гидролиза субстрата в определенных пределах не зависит от  $[S]_0$ , что было проверено во всем исследованном диапазоне условий, и изменение скорости гидролиза субстрата во времени можно считать связанным только с уменьшением концентрации фермента вследствие термоинактивации. Это позволило определять константу скорости инактивации первого порядка по методу Гуггенгейма [18], измеряя зависимость от времени скорости гидролиза бензилпенициллина, катализируемого пенициллинамидазой. Начальный участок полученной кривой соответствует  $V$  для данных условий. Типичный эксперимент проводили следующим образом: 30 мл раствора бензилпенициллина ( $6,6 \cdot 10^{-4}$  М) (или субстрата и полиэлектролита); содержащего 0,01 М КСl, выдерживали в термостатируемой ячейке до установления температуры  $50^\circ$ , затем вводили 0,1 мл раствора пенициллинамидазы с удельной активностью [17] 150 ед/мл и регистрировали кинетическую кривую до уменьшения скорости в 2—3 раза. Начальная концентрация субстрата при этом уменьшалась не более чем на 30%.

Начальную стационарную скорость гидролиза НФФН, катализируемого щелочной фосфатазой, измеряли, регистрируя возрастание оптической плотности реакционной смеси при  $\lambda$  400 нм в результате выделения иона *n*-нитрофенолята с помощью спектрофотометра «Specord UVVis» («Carl Zeiss», Йена). Для вычисления скорости использовали значенномольного коэффициента экстинкции иона *n*-нитрофенолята, равное  $1,8 \cdot 10^4$ , которое не менялось во всем исследованном интервале рН и концентраций СПК. Для приготовления растворов с рН < 9,0 использовали буфер  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 - \text{HCl}$ , а с рН > 9,5 —  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 - \text{NaOH}$ ,  $[\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7] = 0,005$  М во всех случаях. Все эксперименты проводили при  $20^\circ$ , при концентрации НФФН  $9,4 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-3}$  М и концентрации фермента 0,125 мг/мл. Расчет теоретических кривых на рис. 4, 6 производили по способу [19] с использованием уравнений

$$V = \frac{V_{\text{lim}}}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{K}}, \quad (1)$$

$$v_{\text{lim}} = K_{m(\text{как})} \text{lim} \left( 1 + \frac{K}{[\text{H}^+]} \right). \quad (2)$$

Авторы благодарны Е. М. Савицкой и П. С. Ныс за предоставление препарата пенициллинамидазы, а также А. С. Тевлиной и Н. И. Скрипченко за предоставление синтетического поликатиона.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Anderson A. J. (1963) Biochem. J., 88, 460—469.
2. Kint J. A. (1973) FEBS Lctt., 36, 53—56.
3. Nakagaki M., Sano Y. (1972) Bull. Chem. Soc. Jap., 45, 1011—1018.
4. Hofstee V. H. J. (1962) Biochim. et biophys. acta, 55, 440—454.
5. Day L. A. (1973) Biochemistry, 12, 5329—5339.
6. Воробьев В. И. (1972) в сб. Клеточное ядро, М. «Наука», стр. 42—58.
7. Стрельцова З. А., Браудо Е. Е., Толстогузов В. Б. (1975) Биоорган. химия, 1, 267—272.

8. Braudo E. E., Streltsowa Z. A., Tolstogusow W. B. (1974) Charakterisierung, Bewertung und Verarbeitung von Proteinen für Nahrungszwecke, Eisenach.
9. Noguchi H. (1956) *Biochim. et biophys. acta*, **22**, 459—462.
10. Hofstee B. H. J. (1964) *Biochim. et biophys. acta*, **91**, 340—343.
11. Hammond K. D., Balinsky D., Bersohn J., Jersky J. (1973) *Int. J. Biochem.*, **4**, 511—520.
12. Lather A. L., Parsons M. E., Skillen A. W. (1970) *Biochem. J.*, **118**, 299—302.
13. Simpson R. T., Vallee B. L. (1970) *Biochemistry*, **9**, 953—958.
14. Chappellet-Tordo D., Fosset M., Iwatsubo M., Gache C., Lazdunski M. (1974) *Biochemistry*, **13**, 1788—1795.
15. Goldstein L. (1972) *Biochemistry*, **11**, 4072—4084.
16. Goldstein L., Levin Y., Katchalski E. (1964) *Biochemistry*, **3**, 1913—1919.
17. Березин И. В., Клесов А. А., Швядас В. К., Ныс П. С., Савицкая Е. М. (1974) *Антибиотики*, **19**, 880—887.
18. Гургенгейм Э., Пру Дж., (1958) Физико-химические расчеты, стр. 429—430, ИЛ, М.
19. Dixon M. (1953) *Biochem. J.*, **55**, 161—170.

Поступила в редакцию  
17.III.1975

### THE EFFECT OF POLYELECTROLYTES ON THE PROPERTIES OF PENICILLINAMIDASE AND ALKALINE PHOSPHATASE

STRELTSOVA Z. A., SVEDAS V. K., MAKSIMENKO A. V.,  
KLYOSOV A. A., BRAUDO E. E., TOLSTOGUSOV V. B.,  
BEREZIN I. V.

*M. V. Lomonosov State University, Institute of Organometal  
Compounds, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The effect of polyelectrolytes on the catalytic properties of penicillinamidase from *E. coli* and alkaline phosphatase from chick intestine has been studied. The phenomena observed may be adequately explained in terms of pH changes in the microenvironment of the polyelectrolyte-associated enzyme as compared with the pH of the bulk solution. The data obtained and the results of the previous studies allow the suggestion to be made that this effect is common for enzyme-polyelectrolyte systems.

---